



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 199 03 693 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 12 N 9/48**  
C 12 N 9/96  
C 12 Q 1/56  
A 61 K 38/48

⑦1 Aktenzeichen: 199 03 693.4  
⑦2 Anmeldetag: 20. 3. 99  
④3 Offenlegungstag: 28. 10. 99

DE 199 03 693 A 1

⑥6 Innere Priorität:

198 18 495. 6	24. 04. 98
198 27 734. 2	22. 06. 98
198 51 332. 1	06. 11. 98
198 51 336. 4	06. 11. 98
198 51 335. 6	06. 11. 98

⑦1 Anmelder:

Centeon Pharma GmbH, 35037 Marburg, DE

⑦2 Erfinder:

Römisch, Jürgen, Dr., 35041 Marburg, DE; Feußner, Annette, 35043 Marburg, DE; Stöhr, Hans-Arnold, 35083 Wetter, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

⑤4 Protease zur Aktivierung des Gerinnungsfaktors VII

⑤7 Es wird eine Protease zur Aktivierung des Blutgerinnungsfaktor VII beschrieben, die

a) durch Anwesenheit von Aprotinin gehemmt wird,  
b) durch Calcium-ionen und/oder Heparin oder heparinverwandte Substanzen in ihrer Aktivität gesteigert wird und

c) in der SDS-PAGE bei anschließender Färbung im nicht-reduzierten Zustand eine oder mehrere Banden im Molekulargewichtsbereich von 50-75 kDa und im reduzierten Zustand eine Bande bei 40-55 kDa und eine oder mehrere Banden im Molekulargewichtsbereich von 10-35 kDa aufweist.

Es wird auch das Proenzym dieser Protease charakterisiert.

Außerdem wird ein Verfahren zur Gewinnung dieser Protease und ihre Verwendung in der Blutungsprophylaxe oder Blutungsstillung beschrieben. Es werden weiterhin ein stabilisiertes Faktor V- und ein stabilisiertes Faktor VIII-Präparat beschrieben, die von den durch proteolytischen Abbau entstehenden, inaktiven Faktor VIII-Fragmenten durch die Inhibition der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease frei sind. Darüber hinaus wird ein Testsystem zum qualitativen und quantitativen Nachweis einer Protease, die den Blutgerinnungsfaktor VII aktiviert, beschrieben, bei dem die Protease bestimmt wird durch ihre

a) die Blutgerinnungsfaktoren VIII/VIIIa oder V/Va inaktivierende Wirkung oder

b) die Blutgerinnungszeiten verkürzende Wirkung in globalen Gerinnungstests oder

c) Plasminogen-Aktivatoren aktivierende Wirkung.

Schließlich werden pharmazeutische Zubereitungen beschrieben, die zur ...

DE 199 03 693 A 1

## Beschreibung

Gegenstand der Erfindung ist eine Protease zur Aktivierung des Blutgerinnungsfaktors VII, ein Verfahren zu ihrer Gewinnung, zu ihrem Nachweis und zu ihrer Inaktivierung sowie Arzneizubereitungen, die diese Protease enthalten.

Das Blutgerinnungssystem umfaßt zwei unterschiedliche, kaskadenförmige Aktivierungswege von im Plasma anwesenden Gerinnungsfaktoren. Je nach auslösendem Mechanismus dient bevorzugt der endogene oder der exogene Weg zur Initiation der Gerinnung.

Bei einer Gewebeverletzung wird als Starter des exogenen Gerinnungsweges das Thromboplastin (Tissue Factor, TF mit Phospholipiden) von den betroffenen Zellen exponiert. Das membranständige Thromboplastin kann sowohl Gerinnungsfaktor VII (FVII) als auch zirkulierenden, aktivierten FVII (FVIIa) binden. Dieser TF-FVIIa-Komplex führt in Gegenwart von Calcium-Ionen und Lipiden zur Bindung des FX, der durch limitierte Proteolyse in seine aktivierte Form (FXa) überführt wird. FXa wiederum führt durch Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin zur Bildung von Fibrin und damit letztendlich zum Wundverschluß.

Die weitere Aktivierung des an das Thromboplastin gebundenen FVII vollzieht sich anfangs vor allem autokatalytisch, wird aber nach der Initiation der Gerinnungskaskade vor allem durch FXa und Thrombin unterstützt, was zu einer deutlichen Verstärkung der Reaktionskaskade führt.

In bestimmten klinischen Situationen ist die Applikation von FVIIa oder FVIIa-enthaltenden Konzentraten indiziert. Bei Patienten, die bspw. unter Hämophilie A leiden und als Folge der Verabreichung von FVIII Antikörper gegen FVIII entwickelt haben, wird die sogenannte "FVIII bypassing activity" (FEIBA) des FVIIa genutzt. Dabei ist nach den bisherigen Befunden FVIIa gut verträglich und führt zu keiner Thromboseeigung, eignet sich aber dazu, die Gerinnung in einem begrenzten aber ausreichenden Umfang zu gewährleisten. Rekombinanter FVIIa wird bereits therapeutisch und prophylaktisch verwendet. Aus Blutplasma gewonnener FVII kann ebenfalls aktiviert und danach verwendet werden. Zu dieser Aktivierung können Proteasen wie Thrombin verwendet werden, die aber als solche die Gerinnung selbst stark aktivieren und zu einer Thrombosegefährdung führen können. Deshalb ist eine anschließende Entfernung oder Inaktivierung von Thrombin erforderlich und führt zu Ausbeuteverlusten. Die Anwendung von FXa oder FIIa (Thrombin) ist wegen der damit verbundenen Thrombosegefährdung häufig kontraindiziert und nur in Notfällen, z. B. bei extremen Blutverlusten und nicht stillbaren Blutungen angezeigt.

FVIIa wird in sehr geringen Konzentrationen im Plasma gesunder Menschen gefunden. Über die Bildung und Herkunft des im Blut zirkulierenden FVIIa ist bisher nur sehr wenig bekannt. Spuren von exprimiertem oder bei einer Zellerstörung freigesetztem Thromboplastin könnten dabei eine Rolle spielen. Obwohl bekannt ist, daß z. B. Faktor XIIa unter bestimmten Bedingungen zu einer FVII-Aktivierung führen kann, ist die physiologische Relevanz dieser Reaktion noch nicht geklärt.

Überraschenderweise wurde nun bei der Fraktionierung von Humanplasma und von bestimmten Prothrombinkomplex-Konzentraten eine FVII aktivierende Protease gefunden, die sich von allen bisher bekannten Proteasen unterscheidet. Untersuchungen dieser Protease zeigten, daß sie eine besonders hohe amidolytische Aktivität gegenüber dem Peptid-Substrat S2288 (HD-isoleucyl-L-prolyl-L-arginin-pNA) der Firma Chromogenix AB, Schweden) aufweist. Ein besonderes Merkmal dieser Protease ist, daß die amidolytische Aktivität durch Aprotinin gut gehemmt wird. Auch andere Inhibitoren, wie der Antithrombin III/Heparin-Komplex eignen sich zur Inhibition. Dagegen wird ihre Aktivität durch Heparin und mit dem Heparin verwandte Substanzen wie Heparansulfat oder Dextransulfat und Calcium-Ionen erhöht. Es wurde schließlich gefunden, daß diese Protease in Abhängigkeit von der Zeit und ihrer Konzentration in der Lage ist, den FVII in den FVIIa umzuwandeln. Auch diese Reaktion wird durch Aprotinin inhibiert.

Ein Gegenstand der Erfindung ist deshalb eine Protease zur Aktivierung des Blutgerinnungsfaktors VII, die

- a) durch die Anwesenheit von Aprotinin gehemmt wird,
- b) durch Calcium-Ionen und/oder Heparin oder Heparin-verwandte Substanzen in ihrer Aktivität gesteigert wird und
- c) in der SDS-PAGE bei anschließender Färbung im nicht-reduzierten Zustand eine oder mehrere Banden im Molekulargewichtsbereich von 50–75 kDa und im reduzierten Zustand eine Bande bei 40 bis 55 kDa und eine oder mehrere Banden im Molekulargewichtsbereich von 10 bis 35 kDa aufweist.

Im folgenden Text wird die aktivierte Form der Protease als "Protease" bezeichnet, während die nicht-aktivierte Form "Proenzym" genannt wird.

Weitere Untersuchungen mit dieser Protease zeigten, daß sie nach Anreicherung oder Isolierung einen raschen Aktivitätsverlust erleidet, der in einer Lösung enthaltend 20 mM Tris, 0,15 M NaCl bei einem pH-Wert von 7,5 beobachtet wurde. Der Zusatz von Albumin in einer Konzentration von 0,1% konnte nicht verhindern, daß nach einer Stunde bei Raumtemperatur die Aktivität der Protease um 50% vermindert war. Dagegen konnte eine sehr gute Stabilisierung der Protease in einer mit 50 mM Na-Citrat auf einen pH-Wert von 6,5 gepufferten Lösung beobachtet werden. Werden der Proteaselösung keine besonderen Stabilisatoren zugesetzt, dann werden keine bzw. nur geringe Wirkungsverluste beobachtet, wenn sie auf einen pH-Wert zwischen 4 und 7,2, bevorzugt auf einen pH-Wert zwischen 5,0 und 7,0 eingestellt ist. Es ist jedoch zweckmäßig Stabilisatoren der Lösung zuzusetzen, wobei neben Citrat vor allem Glutamat, Aminosäuren wie Arginin, Glycin oder Lysin, Calcium-Ionen und Zucker wie Glukose, Arabinose oder Mannose in Mengen von 1–200 mM/l, bevorzugt in Mengen von 5–100 mM/l in Betracht kommen. Eine gute Stabilisierung wurde auch durch den Zusatz von Glykolen wie Ethylenglykol oder von Glycerin erreicht, wobei Mengen von 5–80 Gew.-%, vorzugsweise von 10–60 Gew.-% angewendet werden. Der pH-Wert der stabilisierten Lösung soll dann zwischen den pH-Werten 4–9 liegen.

Die erfindungsgemäße Protease sowie das Proenzym können nach gentechnologischen Verfahren, vor allem aber durch Fraktionierung von Blutplasma oder von Prothrombinkomplex (PPSB)-Konzentraten gewonnen werden. Dabei wird das Ausgangsmaterial zunächst einer Anionenaustauscher-Chromatographie unterworfen, an die sich eine Affinitäts-

chromatographie des Eluates anschließt. Für die Affinitätschromatographie eignet sich besonders ein auf einer Matrix immobilisiertes Heparin oder eine mit dem Heparin verwandte Substanz wie Heparansulfat oder Dextransulfat. Mit einem derartigen chromatographischen Verfahren kann die erfindungsgemäße Protease und/oder das Proenzym selektiv gebunden und anschließend nach bekannten Verfahren wieder eluiert werden. Zur Kopplung des Liganden an die Matrix empfiehlt sich der Einsatz eines "Spacers". Für die Gewinnung der erfindungsgemäßen Protease hat sich eine Heparin-Lysin-Matrix als besonders geeignet gezeigt.

Die nach diesem Verfahren isolierte Protease zeigt in der SDS-PAGE und anschließender Färbung im nicht reduzierten Zustand eine bis mehrere eng beieinander liegende Banden im Molekulargewichtsbereich von 55–75 kDa. Nach Reduktion beobachtete man eine bis mehrere Banden im Molekulargewichtsbereich von 15–35 kDa und eine Bande bei 40–55 kDa. Eine weitere Bande zwischen 60 und 65 kDa, die nach "Scannen" und quantitativer Auswertung zwischen 5–10% des Gesamtproteins ausmachte, zeigte, dass auch das nicht-aktivierte Proenzym vorhanden war. Dieses Ergebnis wurde durch entsprechende Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern gegen diese Protease unterstützt. Deshalb wird gefolgert, dass auch das Proenzym dieser Protease durch das erfindungsgemäße Verfahren präpariert, pasteurisiert und verwendet werden kann. Ein Gegenstand der Erfindung ist deshalb das Proenzym der Protease zur Aktivierung des Blutgerinnungsfaktors VII. Der Anteil des Proenzym ist durch die Bande zwischen 60 und 65 kDa gekennzeichnet. Entsprechend der Aminosäuresequenz, die die Aktivierungsregion des Proenzymes ausmacht, kommen als physiologische Aktivatoren des Proenzymes gemäß ihren Substratspezifitäten zum Beispiel Thrombin oder FXIIa in Frage.

Einige der beschriebenen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Protease, nämlich ihre Isolierbarkeit aus Plasma oder aus davon abgeleiteten Prothrombinkomplex(PPSB)-Konzentraten, die Hemmung ihrer amidolytischen Aktivität durch Aprotinin und das beschriebene Migrationsverhalten sowohl im reduzierten als auch im nicht-reduzierten Zustand unter SDS-PAGE erinnern an eine von Hunfeld et al. (Ann. Hematol. 1997; 74: A87, 113; Ann. Hematol 1998; 76: A101, P294) isolierte Protease aus einem nicht näher definierten PPSB-Konzentrat. Die Präparation gelang dort im wesentlichen mittels einer Aprotinin-Matrix. Aufgrund der amidolytischen Spaltung von bestimmten Peptidsubstraten wurde die Aktivität als eine Thrombin-ähnliche bezeichnet. Ein Einfluß auf globale Gerinnungsparameter, wie Prothrombinzeit, Quick oder Plättchenaggregation wurde bei Hunfeld et al. nicht gefunden.

Die N-terminale Sequenzierung der von Hunfeld et al. beschriebenen Protease zeigt Übereinstimmungen mit einem Protein, dessen cDNA von Choi-Miura et al. (J. Biochem. 119: 1157–1165 (1996)) beschrieben wurde. Das korrespondierende Protein zeigt in der Primärstruktur eine Homologie zu einem als "Hepatocyte Growth Factor Activating Enzyme (HGFA)" bezeichneten Enzym.

Bei der N-terminalen Sequenzierung zweier unter reduzierenden Bedingungen aus der SDS-PAGE isolierten Banden wurden folgende Übereinstimmungen festgestellt:

Molekulargewichtsbereich der Bande	Aminosäuresequenz	Autor
10 - 35 kDa	IYGGFKSTAGK	Römisch et al.
30 kDa	IYGGFKSTAG	Hunfeld et al.
17 kDa	IYGGFKSTAGKH	Choi-Miura et al.
40 - 55 kDa	LLESLDP	Römisch et al.
50 kDa	SLDP	Hunfeld et al.
50 kDa	SLLESLDPWTPD	Choi-Miura et al.

Übereinstimmungen zeigen sich auch in anderen Testergebnissen wie der Substratspezifität und der Inhibierbarkeit der Aktivität. Trotzdem kann derzeit von einer Identität dieser Proteine noch nicht mit Sicherheit ausgegangen werden. Jedenfalls ist für die früher untersuchten vorstehend genannten Proteine die Eigenschaft einer FVII-Aktivierung bzw. Aktivierung anderer Faktoren (s. u.) nicht beschrieben worden.

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften kann die erfindungsgemäße Protease diagnostisch und therapeutisch angewendet werden.

#### 1. Testsysteme mit der erfindungsgemäßen Protease

Die erfindungsgemäße Protease kann in Testreagenzien diagnostische Verwendung finden. So läßt sich das Vorliegen des Faktors VII qualitativ und quantitativ im Gerinnungstest durch Zusatz der erfindungsgemäßen Protease feststellen.

Umgekehrt läßt sich das zur Messung der FVII-Aktivierung entwickelte Testsystem auch zur Detektion und Quantifizierung der Protease anwenden. Dazu wird eine die Protease enthaltende Lösung mit einer FVII-haltigen Lösung gemischt und nach einer entsprechenden Inkubationszeit die entstandene Menge an FVIIa quantifiziert. Dies kann zum Beispiel mittels des Staclot® FVIIa-rTF Testes (Stago/Boehringer Mannheim) durchgeführt werden. Nach einer bevorzugten Verfahrensweise wird dieser Test nicht durch die angebotene FVII-Konzentration limitiert. Ist die Proteasemenge in Form des Gesamtproteinanteiles bekannt, der

- in einer reinen Proteasepräparation mittels Kjel-dahl-Verfahren oder mittels eines anderen dem Fachmann geläufigen Proteinassays oder
- mit Hilfe eines Antigentests, zum Beispiel basierend auf spezifischen Antikörpern und einem entsprechenden immunchemischen Bestimmungsverfahren wie ELISA ermittelt werden kann, läßt sich entsprechend die spezifische Aktivität der Proteasepräparation messen.

Überraschenderweise wurde nun bei der weiteren Charakterisierung der Protease eine Eigenschaft gefunden, die eine zusätzliche Bestimmungsmethode ermöglicht. Bei der Inkubation der Blutgerinnungsfaktoren VIII/VIIIa und V/Va mit der genannten Protease und anschließender Quantifizierung wurde deutlich, daß die genannten Gerinnungsfaktoren in einer von der Proteasekonzentration und Inkubationsdauer abhängigen Weise inaktiviert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein neues Testsystem zum qualitativen und quantitativen Nachweis der Protease, die den Blutgerinnungsfaktor VII aktiviert, bei dem die Protease durch ihre die Blutgerinnungsfaktoren VIII/VIIIa oder V/Va inaktivierende Wirkung bestimmbar ist. Dieses Testsystem beruht darauf, daß eine die Protease enthaltende Lösung mit dem Faktor VIII/VIIIa oder dem Faktor V/Va inkubiert wird und dann die verbleibende Faktor VIII/VIIIa- oder die verbleibende Faktor V/Va-Menge mittels eines üblichen Aktivitätstests gemessen und daraus durch Vergleich mit einer Standardkurve die Proteasemenge quantitativ bestimmt wird. Dabei wird die Inkubation der Proteaseaktivität nach vorgegebenen Zeitabschnitten durch die limitierte Zugabe von Aprotinin inhibiert, welches den Vorteil hat, dass es in diesen Konzentrationen die anschließenden Messungen des Testsystems nicht beeinflusst. Danach werden dann die restlichen Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren mittels eines dem Fachmann geläufigen Tests gemessen. Besonders bewährt hat sich hierfür ein Testsystem, bei dem der sog. Coamatic® Faktor VIII Test (Chromogenix AB) eingesetzt wird, der im wesentlichen die Faktoren IXa und X enthält, wobei in Gegenwart eines Thrombininhibitors die entstandene Menge an FXa mittels einer Umsetzung eines chromogenen Substrates quantifiziert wird. Diese ist wiederum der FVIII- oder FVIIIa-Menge proportional.

Durch die Bestimmung der FVIII-Restaktivität kann dann auf die vorhandene Proteasekonzentration zurückgeschlossen werden.

Die Degradation des FVIII/FVIIIa oder des FV/FVa durch die proteolytische Einwirkung ist mittels der SDS-PAGE deutlich nachvollziehbar. Abhängig von der Inkubationsdauer der Protease z. B. auf ein FVIII-Konzentrat verschwinden FVIII-typische Banden, während andere neu auftauchen oder schwach vorhandene zunehmen. Dementsprechend läßt sich die Proteaseaktivität auch mit Hilfe der Quantifizierung der abnehmenden oder zunehmenden Banden korrelieren und somit quantitativ z. B. mittels eines Proteasestandards erfassen. Die Änderungen der Bandenintensitäten auf dem SDS-PAGE Elektropherogramm oder nach anderen elektrophoretischen Verfahren läßt sich beispielsweise mit einem dem Fachmann vertrauten "Scanner" samt entsprechendem Programm quantifizieren. Darüber hinaus können Antikörper gegen die genannten Gerinnungsfaktoren zum Western Blotting verwendet und in der beschriebenen Weise zur Evaluierung benutzt werden. Besonders eignen sich Antikörper, die spezifisch die abnehmenden oder vor allem die entstehenden Banden erfassen. Dabei können diese auch zur Etablierung von anderen immunchemischen Tests, wie ELISA, Verwendung finden.

Die für den FVIII/FVIIIa beschriebene proteolytische Inaktivierung wird ebenfalls bei Inkubation der Protease mit dem Faktor V/Va beobachtet, der eine gewisse Strukturhomologie zu FVIII aufweist. In geeigneten Aktivitäts-Testsystemen sowie in der SDS-PAGE/Western Blotting läßt sich die Degradation verfolgen.

Trotz der FV- und FVIII-Inaktivierungen wurde nun gefunden, daß die Zugabe der Protease zu Blut, zu an Plättchen reichem Plasma oder Plasma die Gerinnungszeiten verkürzt, also der prokoagulatorische Effekt in verschiedenen sog. "globalen Gerinnungstests" überwog. Unter diesen Testsystemen versteht man zum Beispiel die nicht-aktivierte partielle Thrombo-plastinzeit (NAPTT), die Prothrombinzeit (PT) und die Rekalkifizierungszeit. Da die Verkürzung dieser Zeiten, gemessen zum Beispiel in sog. Koagulometern, mittels Thrombelastographie oder aber in chromogenen Tests, mit der Konzentration einer gerinnungsfördernden Substanz korreliert, kann umgekehrt anhand einer Eichkurve von der Gerinnungszeit auf die Konzentration der Substanz in einer Probe geschlossen werden. Entsprechend läßt sich die Konzentration des "FVII-Aktivators" mit Hilfe von ausgewählten Gerinnungs-Globaltests bestimmen.

Überraschend war ebenfalls der Befund, daß der "FVII-Aktivor" auch eine effektive Aktivierung der Einketten-Urokinase (scuPA, single chain urokinase plasminogen activator) und des Einketten-tPA (scfPA, single chain tissue plasminogen activator) bewirken kann, also als Plasminogenaktivator-Aktivor (PAA) agieren kann. Die Aktivität der aktivierten PAs kann beispielsweise mittels chromogener Substrate gemessen werden. Diese Eigenschaft kann daher dementsprechend ebenfalls zur Detektion und auch zur Quantifizierung des "FVII-Aktivators" verwendet werden. Die Aktivierung der Plasminogen-Aktivatoren kann in Anwesenheit von Plasminogen in einer gekoppelten Reaktion auch durch die Plasminbildung selbst oder durch die von Plasmin bewirkte Auflösung eines Fibringerinnsels bestimmt werden.

Zusammengefaßt läßt sich also feststellen, daß man die Protease detektieren und auch quantifizieren kann, indem man sie mit einer FVIII- oder FVIIIa-haltigen Lösung inkubiert und danach die restliche FVIII/VIIIa-Menge mittels eines geeigneten Aktivitätstestes bestimmt. In gleicher Weise kann FV oder FVa mit der Protease inkubiert und danach die restliche FV/FVa-Menge quantifiziert werden. Die unbekannte Proteasekonzentration kann durch Vergleich mit einer mitgeführten Standardkurve steigender Proteasemengen quantitativ bestimmt werden. Verschiedene globale Gerinnungstests sind ebenfalls zur Quantifizierung geeignet, indem mit Hilfe der Verkürzung der Gerinnungszeit an einer Eichkurve die Proteasekonzentration abgelesen wird. Auch die PAA-Aktivität der Protease kann zu Bestimmungszwecken genutzt werden.

Ein weiteres Merkmal dieser Tests ist es, daß sich die FV- und die FVIII-Inaktivierung und die PAA-Aktivität besonders gut in Gegenwart genügend hoher Kalziumkonzentrationen entfaltet, bevorzugt  $>0.001$  mM, besonders bevorzugt  $>0.005$  mM, z. B. in Form von  $\text{CaCl}_2$ . Im Gegensatz zum direkten chromogenen Assay, in dem, wie vorstehend beschrieben, sowohl Heparin und heparin-ähnliche Substanzen als auch Kalzium die Proteaseaktivität steigern, wird die FV/FVIII-Inaktivierung durch Heparin nicht oder nur unbedeutend gefördert. Dagegen wird die PAA-Aktivität in Gegenwart beider Agenzien, also durch Kalzium und/oder Heparin oder heparinähnliche Substanzen, stimuliert.

Die durch die Protease vermittelten Reaktionen lassen sich durch Inkubation der Protease mit Inhibitoren, besonders Antithrombin III in Gegenwart von Heparin oder heparin-ähnlichen Substanzen (bevorzugt in Gegenwart von Heparin), C1-Esterase-Inhibitor, alpha2-Antiplasmin, Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor oder bekannten synthetischen, niedermolekularen Protease-Inhibitoren wie das FOIPAN® sehr effektiv verringern oder verhindern. Deshalb kann man diese Substanzen zum Stoppen der Reaktion verwenden, um z. B. Inkubationszeiten exakt zu definieren bzw. die Spezifität des Testes noch zu erhöhen. Auch die Verringerung freier Kalziumionen im Ansatz durch zum Beispiel Chelatbildner ist hierfür verwendbar.

## 2. Stabilisierte Faktor-V- und Faktor VIII-Präparate

Aus den vorstehend beschriebenen Beobachtungen über die proteolytischen Wirkungen der erfindungsgemäßen Protease auf die Gerinnungsfaktoren V und VIII ergab sich nun die weitere Aufgabe, die Protease zu inhibieren oder in ihrer Aktivität zu reduzieren, um Ausbeuteverluste und das Entstehen von eventuell störenden Proteinfragmenten zu vermeiden. Dies gilt umso mehr, als die Herstellung von FV und FVIII meistens aus aus Plasma gewonnenem Kryopräzipitat und in Gegenwart von Kalziumionen erfolgt, weil diese zur Aufrechterhaltung von Protein-Konformationen benötigt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein stabilisiertes FV- oder ein stabilisiertes FVIII-Präparat, das von den durch proteolytischen Abbau entstehenden Faktor V- oder Faktor VIII-Fragmenten frei ist, weil die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease inhibiert ist. Da genauere Untersuchungen gezeigt haben, daß die Faktor V- und die Faktor VIII-Inaktivierung durch die genannte Protease besonders effektiv in Gegenwart von Kalziumionenkonzentrationen über 0,5 mM geschieht, kann eine wirksame Stabilisierung des Faktor V oder des VIII-Präparates erreicht werden, wenn zur Inhibition der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease die Konzentrationen an Kalziumionen im Faktor V- oder im Faktor VIII-Präparat auf weniger als 1,0 mM, vorzugsweise auf weniger als 0,5 mM eingestellt werden. Bei diesen Konzentrationen sind die den Faktor V und den Faktor VIII inaktivierenden Eigenschaften der Protease deutlich reduziert, jedoch reicht die Menge der Kalziumionen noch aus, um das FV- und das FVIII Molekül in ihren Konformationen zu stabilisieren. Die vorstehend genannten Mengen an Kalziumionen sollten nicht nur im Endprodukt, sondern schon im Kryopräzipitat und in den sich anschließenden Reinigungsschritten nicht überschritten werden.

Entsprechend der oben beschriebenen Affinität der Protease bzw. des Proenzymes zu Heparin und heparin-ähnlichen Substanzen, kann die Protease/das Proenzym durch Inkubation mit immobilisiertem Heparin aus der FVIII- bzw. FV-haltigen Lösung entfernt werden.

Zur Verhinderung der proteolytischen Degradation des FV oder des FVIII können jedoch auch natürliche oder synthetische Protease-Inhibitoren, ggf. zusätzlich zu einer Verminderung der Menge an Kalziumionen, eingesetzt werden. Als Inhibitoren können Proteine wie das Aprotinin, das alpha2-Antiplasmin, der C1-Esterase-Inhibitor oder der Inter-Trypsin-Inhibitor eingesetzt werden. Auch niedermolekulare Substanzen, die dem Fachmann als synthetische Serinprotease-Inhibitoren bekannt sind, können hier Verwendung finden. Inhibitoren, deren hemmendes Potential durch Heparin oder Heparinoide erhöht wird, wie das Antithrombin III, können ebenfalls zugesetzt werden. Denn es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß Heparin allein zwar die amidolytische Aktivität der Protease gegenüber kleinen chromogenen Substanzen zu steigern vermag, nicht jedoch die FV/FVIII-Inaktivierung unterstützt.

## 3. Die erfindungsgemäße Protease enthaltende Arzneimittel

Die neue Protease bzw. deren Proenzym können aber auch therapeutisch angewendet werden.

Sie können als Blutgerinnungsmittel entweder allein oder zusammen mit die Proteaseaktivität erhöhenden Substanzen wie Heparin oder dem Heparin verwandten Substanzen wie Heparansulfat und/oder Calcium-Ionen eingesetzt werden, wobei diesem Mittel zusätzlich auch noch der Faktor VII in seiner inaktiven Form zugesetzt sein kann. Die Anwendung eines derartigen Mittels kann z. B. unter Ausnutzung seiner FVIII bypassing activity (FEIBA) angezeigt sein, wenn Unverträglichkeiten gegenüber dem FVIII und/oder FX und/oder FXI und/oder den Proteinen der Kontakphase, wie FXII, z. B. wegen des Vorliegens von Antikörpern, bestehen oder andersartigen Mangelsituationen vorliegen. Die Aktivierung des FVII kann dabei entweder in vitro, im Plasma, in angereicherten Fraktionen oder durch Einwirkung auf gereinigten FVII erfolgen. Auch die Anwendung ex vivo zur allgemeinen Blutungsprophylaxe oder zur Stillung von Blutungen kann mit dem erfindungsgemäßen Blutgerinnungsmittel durchgeführt werden.

Andererseits kann die festgestellte Inhibition der erfindungsgemäßen Protease durch Aprotinin oder die obengenannten Inhibitoren zur Entwicklung eines einen Proteasehemmer enthaltenden Mittels benutzt werden, welches die Gerinnungsfähigkeit des Blutes vermindert. Darüberhinaus lassen sich mittels der erfindungsgemäßen Protease auch physiologische oder nicht-physiologische Faktoren wie synthetische Peptide ermitteln, die wegen ihrer proteasehemmenden Wirkung die Blutgerinnung beeinträchtigen. Dazu können als strukturelle Grundlage die Peptidsequenzen der besonders effektiv umgesetzten chromogenen Substrate dienen, wie die des S 2288 (im Detail, siehe oben). Der Zusatz von geeigneten Inhibitoren zu Gerinnungspräparaten oder bei deren Präparation kann erforderlich werden, wenn diese frei von proteolytischen Aktivitäten sein sollen.

Überraschenderweise wurde nun bei der weiteren Charakterisierung der Protease eine Eigenschaft gefunden, die eine zusätzliche Nutzung der Protease, des sog. "Faktor VII-Aktivators", ermöglicht. Bei der Inkubation von Einketten-Plasminogenaktivatoren wie der Prourokinase (Einketten-Urokinase, scuPA, single chain urokinase plasminogen activator) oder des scIPA (single chain tissue plasminogen activator) bewirkt der "Faktor VII-Aktivator" eine Aktivierung dieser Plasminogenaktivatoren (PA). Dabei findet eine limitierte Proteolyse der Einketten-PAs zur zweikettigen Protease statt, die im besonderen zur Aktivierung des Plasminogens geeignet sind. Das resultierende Plasmin ist der Effektor der Fibrinolyse, also des physiologischen Systems, das für die Auflösung von Thromben zuständig ist. PAs, wie Prourokinase oder tPA sind körpereigene Proteine, die bei Bedarf freigesetzt und bekanntermassen durch Plasmin oder durch Kallikrein (scuPA) aktiviert werden. Die Aktivierung der scuPA im gesunden Zustand ist bisher noch nicht vollständig geklärt.

Therapeutisch werden die Plasminogenaktivatoren als isolierte oder rekombinant hergestellte Proteine in pharmazeutischen Zubereitungen bei thromboembolischen Erkrankungen oder Komplikationen eingesetzt, wie bei der Beinvenenthrombose, dem Herzinfarkt oder Schlaganfällen.

Entsprechend der jetzt aufgefundenen Eigenschaft des "Faktor VII-Aktivators" kann dieser zur endogenen oder exogenen Aktivierung von Plasminogenaktivatoren wie der Prourokinase oder des scTPAs verwendet werden. Diese Aktivität kann auch durch Anwendung der genannten Protease zur Prophylaxe oder Therapie von thromboembolischen Erkrankungen Anwendung finden, und zwar auch in Kombination mit Einketten- oder Zweiketten-Plasminogenaktivatoren oder Antikoagulanzen. Diese Anwendungsmöglichkeit steht nicht im Widerspruch zu der Tatsache, dass die Protease auch prokoagulatorisch wirken kann. Die Frage, welche der beiden Reaktionen überwiegt, regelt sich wahrscheinlich durch die Verfügbarkeit der physiologischen Substrate. Nach dem derzeitigen Stand des Wissens wird der Faktor VII im Plasma moderat aktiviert und hält ständig eine bestimmte Konzentration an FVIIa aufrecht, um plötzlichen Gefäßverletzungen sofort entgegenwirken zu können. Dagegen findet man beim Tissue-Plasminogenaktivator und beim Urokinase-Plasminogenaktivator nur Nanogramm-Mengen in einem ml Blutplasma. Erst bei Fibrinablagerung oder Thromben erhöht sich die Konzentration an Plasminogenaktivatoren durch Sekretion oder Synthese, die nach Aktivierung lokal, besonders thrombusgebunden, ihre thrombolytische Aktivität durch Plasminogenaktivierung entfalten. In Anwesenheit von Einketten-PAs, besonders lokal begrenzt, könnte deren Aktivierung die FVII-Aktivierung überwiegen, wodurch eine Anpassung an die physiologische Situation möglich ist. Entsprechend könnte diese Protease auch die Hämostase regulieren, wodurch eine Substitution mit der Protease und/oder des Proenzymes bei angeborenen und erworbenen Mangelzuständen angezeigt ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb eine pharmazeutische Zubereitung, die eine zur Auflösung von fibrinhaltigen Thromben ausreichende Menge der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease und/oder deren Proenzymform enthält. Diese Zubereitung kann ausserdem Einketten-Plasminogenaktivatoren (PA) und/oder Anti-koagulanzen enthalten.

Da sich gezeigt hat, dass die Plasminogenaktivatoren verstärkende Wirkung des "FVII-Aktivators" besonders durch Kalzium und/oder Heparin und heparinähnliche Substanzen wie Dextransulfat gefördert wird, können zur erfindungsgemässen Auflösung von fibrinhaltigen Thromben besonders vorteilhaft pharmazeutische Zubereitungen eingesetzt werden, die zusätzlich lösliche Kalziumsalze und/oder Heparin oder heparinähnliche Substanzen enthalten. Dabei kann die Protease/das Proenzym allein oder in Kombination mit Einketten- oder Zweiketten-Plasminogenaktivatoren ohne oder mit Substanzen eingesetzt werden, die besondere Affinitäten zu der Protease aufweisen und damit deren Aktivität als Trägersubstanz zur Verlängerung der Plasmahalbwertszeit oder als Vermittler zu Oberflächen erhöhen.

Aufgrund seiner besonderen fibrinolytischen Wirkung können pharmazeutische Zubereitungen, die die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease enthalten, zur Behandlung von Erkrankungen eingesetzt werden, die durch fibrinhaltige Thromben verursacht werden. Auch bei Wundheilungsprozessen spielen fibrinolytische Prozesse eine Rolle. Dabei kann die genannte Protease und/oder das Proenzym intravenös oder lokal, subkutan, intradermal, intramuskulär oder bei Verletzungen und Wunden auch topisch oder gebunden an eine geeignete Trägermatrix erfolgen. Dabei kann nicht nur die aus Körperflüssigkeiten wie Blut oder Plasma gewonnene Protease/Proenzym, sondern auch rekombinant oder transgen hergestellte Protease/Proenzym eingesetzt werden. Auch als Bestandteil eines sog. Fibrinklebers kommt die Protease/Proenzym in Frage, der dann eine die Protease/Proenzym hemmende Substanz, wie Aprotinin, nicht enthalten sollte. Dabei können die gerinnungsverkürzenden Eigenschaften der Protease genutzt werden.

#### 4. Verfahren zur Pasteurisierung der FVII aktivierenden Protease

Als ein aus Humanplasma isoliertes Protein kann die erfindungsgemässe Protease und/oder ihr Proenzym nur dann als pharmazeutische Zubereitung eingesetzt werden, wenn sie vorher einem Verfahren zur Virusinaktivierung unterworfen worden ist. Besonders das Pasteurisierungsverfahren ist als das wichtigste Verfahren zur Virusinaktivierung anerkannt. Eine Erhitzung von bis zu 10 Stunden bei etwa 60°C setzt jedoch eine ausreichende Stabilität des zu behandelnden Proteins voraus. Die optimalen Stabilisatoren müssen für jedes Protein gesondert ermittelt und deren Konzentrationen optimiert werden.

Für die erfindungsgemässe Protease und/oder ihr Proenzym sind bereits vorstehend Bedingungen genannt worden, die das Protein in Lösung stabilisieren, ohne dass eine Pasteurisierung vorgenommen wird. Besonders ein leicht saurer pH-Bereich hat sich diesbezüglich als vorteilhaft herausgestellt. Bei einer Pasteurisierung unter diesen Bedingungen verliert die erfindungsgemässe Protease und/oder ihr Proenzym jedoch in der Regel mehr als 50% ihrer ursprünglichen Aktivität.

Es wurde nun gefunden, dass eine Pasteurisierung einer die erfindungsgemässe Protease und/oder ihr Proenzym enthaltenden pharmazeutischen Zubereitung optimale Stabilisierungserfolge gewährleistet, wenn die Zubereitung

- a) in einem pH-Bereich von 3,5 bis 8,0, vorzugsweise in einem pH-Bereich von 4,0 bis 6,8;
- b) unter Zusatz einer oder mehrerer Aminosäuren in einer Menge von mehr als 0,01 mol/l, vorzugsweise mehr als 0,05 mol/l; und/oder
- c) unter Zusatz eines Zuckers oder einer Kombination verschiedener Zucker mit einer Gesamtkonzentration von mehr als 0,05 g/ml, vorzugsweise mehr als 0,2 g/ml; und/oder
- d) unter Zusatz ein oder mehrerer Substanzen, die Kalziumionen zu komplexieren vermögen, wie Zitrat, Oxalat, Ethylendiamintetraessigsäure usw. hergestellt wird.

Auch Zusätze wie Albumin, Haemacel®, Heparin und Heparinoide, Glycerin, Glykol und Polyethylenglykol können separat oder in Mischung Verwendung finden. Nach Beendigung der Pasteurisierung können die als Stabilisatoren zugesetzten Zucker, Aminosäuren und anderen Zusatzstoffe mit dem Fachmann vertrauten Verfahren vermindert oder aus der Zubereitung ganz entfernt werden. Die Ergebnisse der Pasteurisierungsverfahren sind in den Beispielen 12 und 13 enthalten.

## Beispiel 1

Zur Demonstration der Aktivierung von FVII durch die präparierte Protease wurde das Staclof® FVIIa-rTF-Testsystem (Stago/Boehringer Mannheim) verwendet. Dieses Detektionssystem beruht auf der besonderen Eigenschaft des (rekombinanten) löslichen Tissue Factors (rTF), der ausschließlich den präformierten aktivierten FVII (FVIIa) zur Initiation des exogenen Gerinnungsweges verwenden kann. Damit wird, anders als beim vollständigen Tissue Factor, eine genaue Bestimmung des aktuellen FVIIa Gehaltes möglich.

Für die Aktivierungsexperimente wurde isolierter FVII (Enzyme Research Labs) verwendet. Dieser enthält selbst Spuren FVIIa, da er aus Humanplasma isoliert wird. Die Konzentration wurde durch Verdünnung mit Puffer auf 0,05 IU/ml FVII eingestellt. FVII wurde mit den Testsubstanzen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf den aktuellen FVIIa-Gehalt getestet. Die FVIIa-Gehalte wurden anhand der parallel erstellten Referenzkurve quantifiziert.

In Vorversuchen, die hier nicht beschrieben werden, wurde ermittelt, daß das Aprotinin in der verwendeten Konzentration die Aktivität der präparierten Protease vollständig inhibierte, jedoch weder FVIIa direkt noch das FVIIa-rTF Testsystem signifikant beeinflusste.

Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich jeweils auf Dreifachbestimmungen.

Entsprechend wurden folgende experimentelle Ansätze durchgeführt:

## 1. FVII

Resultat: 10 mlU/ml FVIIa

Nicht aktivierter FVII diene als Kontrollansatz. Dieser enthält bereits Spuren von FVIIa (siehe oben) in der Größenordnung 10 mlU FVIIa/ml.

## 2. FVII + Aprotinin

In diesem Ansatz wurde FVII in Anwesenheit von Aprotinin inkubiert und in den FVIIa-rTF Assay eingesetzt, um zu zeigen, daß weder FVIIa selbst inhibiert noch der Test durch das verwendete Aprotinin beeinflusst wurde. Dies wurde bestätigt (im Vergleich zu Ansatz 1).

## 3. Protease + FVII (Inkubation), danach Zugabe von Aprotinin

Resultat: 18 mlU/ml FVIIa

Der Protease wurde hier Zeit gegeben, um FVIIa zu aktivieren. Erst nach der 10 minütigen Inkubation wurde Aprotinin zugegeben, um die Protease zu inhibieren. Entstandener FVIIa wurde im FVIIa-rTF Assay quantifiziert. Abzüglich des FVIIa Basiswertes (Ansatz 1) sind unter den gewählten Bedingungen also 8 mlU/ml FVIIa durch die Proteaseeinwirkung entstanden.

## 4. Protease + Aprotinin, danach Zugabe von FVII

Resultat: 11 mlU/ml FVIIa

In diesem Ansatz wurde die Protease vor Kontakt mit FVII mit Aprotinin inhibiert. Weder die anschließende Inkubation mit FVII noch die folgende FVIIa Quantifizierung zeigte einen signifikanten Anstieg des FVIIa-Gehaltes (11 versus 10 mlU/ml in Ansatz 1 ist aufgrund des Assay-Schwankungsbreite als nicht signifikant zu werten).

## 5. Protease

Resultat: 0 mlU/ml FVIIa

Durch diesen Ansatz wurde demonstriert, daß die Protease in der gewählten Konzentration selbst keinen Einfluß auf das FVIIa-rTF Testsystem zeigte.

Zusammenfassend ergibt sich hieraus, daß

- die beschriebene Protease FVII aktiviert;
- die Aktivierung von FVII durch die Protease "direkt" erfolgt, also unabhängig von der Anwesenheit des rTF;
- die Aktivierung von FVII durch Aprotinin hemmbar ist, Aprotinin selbst das Testsystem in der gewählten Konzentration nicht signifikant beeinflusst.

## Beispiel 2

Dieses Beispiel beschreibt, daß die Aktivierung von FVII in einer von der Konzentration der Protease und der Inkubationszeit der Protease mit FVII abhängigen Reaktion erfolgt.

Testsysteme und Reagenzien wurden entsprechend den in Beispiel 1 beschriebenen Bedingungen gewählt. In einer ersten Versuchsreihe wurde der vorgelegte FVII mit verschiedenen Verdünnungen (1 : 5, 1 : 10, 1 : 20) der Protease enthaltenden Lösungen vorinkubiert (5 min RT), danach mit Aprotinin versetzt (zur Inhibition der Protease) und anschließend

im FVIIa-rTF Assay auf den Gehalt an FVIIa geprüft.

Als Kontrollansätze dienten wiederum die Parallelansätze, bei denen die Protease vor Kontakt mit FVII durch Aprotinin inhibiert worden war.

Die Ergebnisse sind als Aktivierungsfaktor angegeben, d. h. entsprechen dem x-fachen dessen, was in dem o.g. Kontrollansatz selbst gemessen wurde:

	Ansatz	Kontrolle
10	Protease+FVII	Protease+Aprotinin
	Inkubation	Inkubation
15	+ Aprotinin	+ FVII

### Aktivierungsfaktor

Verdünnung der

Proteaselösung

	1 : 5	2,6	1,0
30	1 : 10	2,0	1,0
	1 : 20	1,6	1,0

Der Aktivierungsfaktor 1,0 der Kontrollansätze entspricht der zusätzlich eingeschlossenen Kontrolle, bei der lediglich der Testpuffer mit dem verwendeten FVII unter identischen Inkubationsbedingungen behandelt und getestet wurde. Das heißt, es fand keine signifikante Aktivierung in den Kontrollansätzen statt.

Hieraus ergibt sich, daß die Aktivierung von FVII durch die Protease in einer von der Konzentration der Protease abhängigen Weise erfolgt.

In ähnlicher Weise wurde gezeigt, daß sich die Aktivierung von FVII durch die Protease bei konstant gehaltenen Konzentrationen der Reaktionspartner in einer von der Inkubationsdauer abhängigen Weise vollzieht.

Bei Inkubation gleicher Volumina einer 0,2 IU/ml FVII enthaltenden Lösung mit einer 1 : 10 verdünnten Proteaselösung ergaben sich nach entsprechenden Inkubationszeiten und anschließender Zugabe von Aprotinin (um die Aktivierung zu stoppen) folgende FVIIa-Gehalte:

Inkubationsdauer	Aktivierungsfaktor
0 min	1,0
2,5 min	1,3
5,0 min	2,0
10,0 min	2,8
50 40,0 min	> 3,8

Hieraus ergibt sich, daß sich die Aktivierung von FVII durch die Protease in einer von der Zeit abhängigen Weise vollzieht.

### Beispiel 3

Anhand dieses Beispiels soll demonstriert werden, daß die Aktivierung von FVII durch die Protease in Anwesenheit von Calcium-Ionen und Heparin erhöht wird.

25 µl der Protease enthaltenden Lösung wurde mit 50 µl

- Puffer (Kontrolle)
- 15 mM CaCl<sub>2</sub>
- 50 USP-E Heparin/ml
- 65 - Pathromtin (Lipidgemisch, Abfüllung nach Angaben des Herstellers gelöst)

gemischt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 150 µl einer Tris/NaCl-Pufferlösung (pH 8,2) und 25 µl des chromogenen Substrates S2288 (3 mM) versetzt und die zeitabhängige Änderung der Extinktion bei 405 nm (bei 37°C) ge-



messen. Angegeben sind Aktivierungsfaktoren bezogen auf die Puffer-Kontrolle (x-fach).

Ansätze	Aktivierungsfaktor (x-fach Puffer-Kontrolle)	
Puffer-Kontrolle	1,0	5
+ CaCl <sub>2</sub>	3,6	
+ Heparin	2,6	
+ Lipid	0,9	
+ CaCl <sub>2</sub> + Heparin	4,3	
+ CaCl <sub>2</sub> + Lipid	3,3	10
+ Heparin + Lipid	2,7	
+ CaCl <sub>2</sub> + Heparin + Lipid	3,7	

Unter den Bedingungen dieses Beispiels sind deutliche Aktivitätssteigerungen der Protease in Anwesenheit von Calcium-ionen und/oder Heparin zu vermerken. 15

#### Beispiel 4

Jeweils 25 µl einer Lösung, die 10, 1 oder 0,1 µg/ml der Protease enthält, wurden mit 25 µl FVIII (2 IU/ml) gemischt und anschließend mit 25 µl CaCl<sub>2</sub> (25 mM) und 25 µl Pathromtin® (Dade Behring GmbH) versetzt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 0, 3, 10 und 20 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 µl Aprotinin (500 KIE/n-d) gestoppt. Als eine Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem Aprotinin vorgelegt wurde. 20

Jede Probe wurde in Tris-Puffer/BSA verdünnt. Je 50 µl dieser Lösung wurden mit 50 µl des Faktorenreagenzes (im Wesentlichen bestehend aus FIXa, FX und einem Thrombininhibitor, entsprechend modifiziert nach dem Coamatic® FVIII Test, Chromogenix AB) gemischt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Substrat (z. B. S 2765, N-a-Cbo-D-Arg-Gly-Arg-pNA) wurde die Reaktion nach einer bestimmten Inkubationsdauer durch Zugabe von 50 µl Essigsäure (50%) gestoppt und die OD<sub>405nm</sub> gemessen. Eine FVIII-Standardkurve diente der Ermittlung der Probenkonzentration. 25

#### Ergebnis

In einem ersten Ansatz wurde die Inkubationszeit von Protease mit FVIII (2 IU/ml) konstant gehalten (10 min), jedoch die Proteasekonzentration variiert (0,1, 1 und 10 µg/ml). Die Reaktion wurde gestoppt und die restliche Konzentration an aktivem FVIII bestimmt. Mit steigender Proteasekonzentration wurde entsprechend mehr FVIII inaktiviert (Abb. 1). 35

Mit Hilfe einer entsprechenden Standardkurve läßt sich der Proteasegehalt einer Probe quantifizieren.

In einem zweiten Ansatz wurde die Proteasekonzentration konstant gehalten (10 µg/ml), jedoch die Inkubationszeit mit FVIII (2 IU/ml) variiert. Mit zunehmender Inkubationsdauer zeigte sich eine deutliche Reduktion der verbleibenden Konzentration an aktivem FVIII (Abb. 2). 40

#### Beispiel 5

Der Einfluß des "FVII-Aktivators" auf die Faktor V Aktivität wurde untersucht:

25 µl protease-haltige Lösung (0–100 µg/ml) wurde mit 50 µl FV (5 IU/ml) und 25 µl 25 mM CaCl<sub>2</sub> inkubiert (0–20 min) und danach mit 400 µl Puffer enthaltend 100 KIE/ml Aprotinin versetzt. 45

Je 100 µl eines jeden Inkubationsansatzes wurden dann mit 100 µl FV-Mangelplasma für 1 min bei 37°C inkubiert, mit 200 µl Thromborel S® gemischt und die Gerinnungszeiten im Koagulometer nach Schnitger und Gross bestimmt. Die Restaktivitäten des FV wurden ermittelt. 50

#### Ergebnis

**Protease Konzentration**  
(µg/ml)

**Restaktivität FV**  
**Inkubationszeit von Protease mit**

**FV (min)**

	0	10	20
10	93	91	100
30	100	93	28
100	100	29	13

Dieses Beispiel zeigt, daß der FV durch die Protease mit der Zeit inaktiviert wurde. 65

## Beispiel 6

Der Einfluß des "FVII-Aktivators" auf die Gerinnungszeiten in sog. Globaltests wurde mit Hilfe von Koagulometern nach Schnitger und Gross untersucht. Alle aufgeführten Differenzwerte entsprechen den um diesen Betrag verkürzten Gerinnungszeiten.

## NAPTT (Nicht-aktivierte partielle Thromboplastinzeit)

Die protease-haltige Lösung wurde mit Puffer auf 100 µg/ml, 30, 10 und 3 µg/ml verdünnt. Jeweils 100 µl dieser Lösung wurden mit 100 µl Citrat-Plasma (Standard Human Plasmapool oder Einzelspender) und 100 µl Pathromtin® für 2 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 100 µl 25 mM CaCl<sub>2</sub> versetzt und danach die Gerinnungszeiten ermittelt. Die Differenzen zwischen diesen Meßwerten und den entsprechenden Gerinnungszeiten, die mit Pufferlösung anstelle der Protease ermittelt wurden, wurden bestimmt.

Probe Nr.	Differenz Gerinnungszeiten (Puffer-Probe) (sec)				
	Protease Konzentration (µg/ml)				
	0	3	10	30	100
Standard Human Plasma (213 sec)	0	13	20	42	43
1	0	20	33	42	41
2	0	27	31	45	47
3	0	13	14	23	29
4	0	18	37	51	50
5	0	25	49	54	46

## Plasma-Rekalzifizierungszeit

Die protease-haltige Lösung wurde mit Puffer auf 100 µg/ml, 30, 10 und 3 µg/ml verdünnt. Jeweils 100 µl dieser Lösung wurden mit 100 µl Citrat-Plasma (Standard Human Plasmapool oder Einzelspender) für 1 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 100 µl 25 mM CaCl<sub>2</sub> versetzt und danach die Gerinnungszeiten ermittelt. Die Differenzen zwischen diesen Meßwerten und den entsprechenden Gerinnungszeiten, die mit Pufferlösung anstelle der Protease ermittelt wurden, wurden bestimmt.

Probe Nr.	Differenz Gerinnungszeiten (Puffer-Probe) (sec)					
	Protease Konzentration (µg/ml)					
	0	3	10	30	100	5
Standard Human Plasma (283 sec)	0	17,2	15,1	30,5	50,4	10
						15
1	0	29,8	51,7	60,3	90,1	
2	0	25,2	51,7	69,5	101,3	
3	0	28,0	---	39,0	74,6	20
4	0	27,3	42,7	55,6	91,8	
5	0	44,3	69,1	101,2	134,2	25

## PT (Prothrombinzeit)

Die protease-haltige Lösung wurde mit Puffer auf 100  $\mu\text{g/ml}$ , 30, 10 und 3  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt. Jeweils 100  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden mit 100  $\mu\text{l}$  Citrat-Plasma (Standard Human Plasmapool oder Einzelspender) für 1 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 200  $\mu\text{l}$  Thromborel S® (Dade Behring GmbH) versetzt und danach die Gerinnungszeiten ermittelt.

Die Differenzen zwischen diesen Meßwerten und den entsprechenden Gerinnungszeiten, die mit Pufferlösung anstelle der Protease ermittelt wurden, wurden bestimmt.

Probe Nr.	Differenz Gerinnungszeiten (Puffer-Probe) (sec)					
	Protease Konzentration (µg/ml)					
	0	3	10	30	100	
Standard Human Plasma (13,6 sec)	0	1,0	1,7	1,5	2,4	45
1	0	0,7	1,3	2,4	2,7	50
2	0	0,3	0,4	1,7	3,1	
3	0	0,4	0,7	1,5	1,8	55
4	0	0,1	0,7	1,8	3,1	
5	0	0,3	0,5	1,2	2,8	

Die Gerinnungszeiten der genannten Globaltests wurden in einer von der Konzentration der Protease abhängigen Weise verkürzt. Entsprechend liess sich nach "Eichung" eines verwendeten Plasmas mit einer bekannten Menge des "FVII-Aktivators" unter Ablesung von einer Standardkurve die Proteasekonzentration einer Probe ermitteln.

## Beispiel 7

Die Plasminogenaktivatoren aktivierenden Eigenschaften des "FVII-Aktivators" wurden an der Einketten-Urokinase (scuPA) und des Einketten-tPA (sc1PA) untersucht.

**Ansatz:**

- 0,1 ml PAA-Lösung (20 µg/ml scuPA oder 100 µg/ml sctPA)  
 +0,1 ml Test-Puffer oder  
 100 U Heparin/ml in Test-Puffer oder  
 5 20 mM CaCl<sub>2</sub> im Test-Puffer  
 + 0,5 ml Test-Puffer  
 + 0,1 ml Protease/Probe (steigende Konzentrationen:  
 2–10 µg/ml scuPA oder  
 50–200 µg/ml sctPA)  
 10 Inkubation bei 37°C  
 + 0,1 ml 100 KIE Aprotinin/ml in Test-Puffer  
 Inkubation für 2 min bei 37°C  
 ü 0,1 ml Substrat S-2444 (3 mM).

- Als Kontrolle wurde anstelle des Plasminogenaktivators (PA) vor der ersten Inkubation Aprotinin vorgelegt und je-  
 15 weils mitgeführt. Dafür wurde anstelle des Aprotinin erst später PA zugegeben.

Die  $\Delta OD_{405nm}$  wurde photometrisch bestimmt. Die ermittelten Kontroll-Werte wurden von den Proben/Proteasewer-  
 ten abgezogen und sb die durch die PAA Aktivität verursachte PA-Aktivität) in mIU/min) bestimmt.

**Ergebnis**

20

scuPA-Aktivierung (20 µg/ml scuPA 2–10 µg/ml "FVII-Aktivator")

**A. Stimulanz: ohne**

25	Inkubationszeit (min)	resultierende PA-Aktivität ( $\Delta$ mIU/min) "FVII-Aktivator" (µg/ml)		
		2	5	10
30				
	2	25	60	117
35	5	79	179	165
	10	186	449	517

40

**B. Stimulanz: Heparin**

45	Inkubationszeit (min)	resultierende PA-Aktivität ( $\mu$ mIU/min) "FVII-Aktivator" (µg/ml)		
		2	5	10
50				
	2	190	332	425
	5	330	455	458
55	10	417	462	460

60

65

B. Stimulanz: CaCl<sub>2</sub>

Inkubationszeit (min)	resultierende PA-Aktivität (Δ mIU/min) "FVII-Aktivator" (μg/ml)			
	2	5	10	
2	255	370	401	10
5	338	424	438	
10	416	445	448	15

Die Tabellen veranschaulichen, daß scuPA in einer von der Konzentration des "FVII-Aktivators" und der Inkubationsdauer abhängigen Weise aktiviert wurde. Dabei wirkten sowohl Heparin als auch Kalzium stimulierend auf die durch die Protease verursachte Aktivierung des PA.

scuPA-Aktivierung (100 μg/ml scuPA, 50–200 μg/ml "FVII-Aktivator")

Da die Umsatzrate des aktivierten tPA gegenüber dem tPA-Proenzym lediglich um den Faktor 3–4 zunimmt, (die der uPA jedoch um das 1.000–1.500-fache), mussten höhere Konzentrationen beider Reaktionspartner (siehe oben) gewählt werden, um ein auswertbares Messignal zu erhalten.

Inkubationszeit (min)	resultierende PA-Aktivität (Δ mIU/min) "FVII-Aktivator" (200 μg/ml)		
1	10,2		30
2	16,8		35
5	38,8		
10	60,2		40
20	73,3		

B. Abhängigkeit von der Konzentration des "FVII-Aktivators" (Inkubationszeit: 20 min 37°C), Stimulanz: Heparin (100 IU/ml)

"FVII-Aktivator" (μg/ml)	PA-Aktivität (Δ mIU/min)	
50	33,6	50
100	51,0	55
200	71,9	

Stimulanz	PA-Aktivität ( $\Delta$ mIU/min)
ohne	5,9
CaCl <sub>2</sub>	25,3
Heparin	63,8

5

10

Die Tabellen demonstrieren, daß auch scPA in einer von der Konzentration der Protease und der Inkubationszeit abhängigen Weise aktiviert wurde. Sowohl Heparin als auch Kalziumionen hatten eine stimulierende Wirkung auf den "FVII-Aktivator" hinsichtlich seiner PA-Aktivierung.

15

## Beispiel 8

Zwei FVIII enthaltende Lösungen, die eine im wesentlichen frei von von Willebrand Faktor und die andere vWF-haltig, wurden mit der obengenannten Protease in Gegenwart von Kalzium inkubiert. Nach bestimmten Zeiten wurden die restlichen FVIII-Aktivitäten mittels eines chromogenen Testes bestimmt und in Relation zu den Kontrollansätzen ohne Protease gesetzt.

20

Dazu wurden 25  $\mu$ l einer 0,1 IU/ml FVIII enthaltenden Lösung mit dem gleichen Volumen der Proteaselösung (10  $\mu$ g/ml) versetzt und mit 25  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> (25 mM) gemischt. Nach Inkubationsdauern von 0, 5, 10 und 20 min bei 37°C wurden die Ansätze mit je 400  $\mu$ l einer 200 KIE/ml Aprotinin enthaltenden Lösung versetzt, um die proteolytische Aktivität der Protease zu stoppen. Vorversuche hatten gezeigt, daß diese Aprotininkonzentration keinen wesentlichen störenden Einfluß auf den nachfolgend beschriebenen FVIII-Aktivitätstest hatte (Ansätze 1+3). In Ansatz 2 wurde die Protease vor Kontakt mit FVIII mit Aprotinin inkubiert und danach verfahren wie oben beschrieben.

25

Je 50  $\mu$ l der gestoppten Probe (bzw. nach weiterer Verdünnung) wurden danach mit dem sog. Faktorenreagenz, im wesentlichen bestehend aus FXa, FX und einem Thrombininhibitor versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 50  $\mu$ l eines chromogenen Substrates, das durch aktivierten FX gespalten wird, wurde die Reaktion nach 5 minütiger Inkubation durch Zugabe von 50  $\mu$ l Essigsäure (50%) gestoppt und die delta OD<sub>405nm</sub> quantifiziert. Die FVIII Aktivität (mIU) wurde anhand einer Standardkurve, die mit Hilfe einer mitgeführten Verdünnungsreihe des FVIII-Konzentrates erstellt wurde, ermittelt.

30

35

Die FVIII-Aktivitäten sind in Prozent der nicht mit Protease versetzten Kontrollen dargestellt.

## Ergebnis

40

## FVIII-Aktivität (%)

## Ansatz

## Inkubationsdauer (min)

		0	5	10	20
45	1. FVIII	97	27	11	<1
	2. FVIII/Aprotinin	98	97	97	96
50	3. FVIII/vWF	98	16	14	1

In Gegenwart von CaCl<sub>2</sub> (hier 6,25 mM) wurde FVIII durch die Protease in einer von der Inkubationsdauer abhängigen Weise inaktiviert. Der vWF schützte den FVIII nicht vor Inaktivierung durch die Protease. Die Inhibition der Protease mit Aprotinin vor Kontakt mit FVIII verhinderte dessen Inaktivierung.

55

## Beispiel 9

Diese Versuchsreihe wurde durchgeführt wie in Beispiel 1/Ansatz 1 beschrieben, jedoch wurden hier die Kalziumkonzentrationen in den Mischungen aus Protease und FVIII variiert. Dazu wurde aus der Kalzium-Stammlösung CaCl<sub>2</sub> zugegeben bis zu den in der Abb. 3 dargestellten Endkonzentrationen.

60

## Ergebnis

Wird die Kalziumkonzentration im Ansatz unter 1 mM gesenkt, werden unter diesen Bedingungen ca. 50% des FVIII verschont. Unter 0,5 mM Kalzium sind es bereits mehr als 60% (Abb. 1).

65

## Beispiel 10

Der Einfluss des "FVII-Aktivators" auf die Gerinnungszeiten in sog. Globaltests wurde mit Hilfe der Thrombelastographie untersucht.

Mit einem TEG-Meter (Fa. Hellige) nach Hilgard wurde die Änderung der Scherelastizität bzw. die Festigkeit des entsprechenden Blutgerinnsels fortlaufend registriert. Bei den sog. r-, bzw. k-Werten handelt es sich um die Zeiten vom Beginn der Blutabnahme bzw. dem Start der Gerinnungsreaktion, bei Citrat-Blutplasma um den Zeitpunkt der Rekalzifizierung bis zur Verbreiterung der TEG-Kurve um 1 mm bzw., die Zeit vom Endpunkt des r-Wertes bis zur Verbreiterung der Kurve auf 20 mm (Gerinnselbildungszeit).

Dazu wurden 150 µl Blut oder Plasma vom 5 Spendern jeweils in den Messküvetten bei 37°C für 2 min inkubiert und danach 50 µl Probe (Protease) zugemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 25 mM CaCl<sub>2</sub> gestartet. Die Endkonzentration des "FVII-Aktivators" im Ansatz betrug 30 µg/ml. Die Verkürzung der r-Zeit wurde in Relation zum Ansatz gemessen, der anstelle der Probe Puffer enthielt.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## Ergebnis

Blut Nr.	Probe	r-Zeit (min)	k-Zeit (min)	r+k-Zeit (min)
1	Protease	5,2	3,4	8,6
1	Puffer	7,8	5,6	13,4
2	Protease	5,2	5,1	10,3
2	Puffer	6,8	7,1	13,9
3	Protease	4,0	5,2	9,2
3	Puffer	6,5	6,3	12,8
4	Protease	4,5	4,8	9,3
4	Puffer	4,8	6,0	10,8
5	Protease	4,2	3,8	8,0
5	Puffer	7,0	5,8	12,8

Plasma-Nr.	Probe	r-Zeit (min)
1	Protease	9,0
1	Puffer	11,3
2	Protease	9,2
2	Puffer	12,5
3	Protease	9,5
3	Puffer	9,6
4	Protease	8,2
4	Puffer	12,1
5	Protease	9,7
5	Puffer	14,1

Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die Zugabe der Protease in fast allen Fällen eine deutliche Verkürzung der Gerinnungszeit zur Folge hatte. Die fibrinolytischen Eigenschaften des "FVII-aktivators" traten hier in den Hintergrund. Ein Grund dafür ist, dass in "Normalpersonen" die Plasminogenaktivator-Konzentrationen im Plasma im Nanogramm-Bereich liegen und in dem in-vitro Gerinnungstest nicht zum Tragen kommen.

## Beispiel 11

Die FVIII "Bypassing Activity" der Protease wurde durch folgenden Versuchsansatz demonstriert: Als Messtechnik diente die Thrombelastographie. Ausgewertet wurde die r-Zeit (siehe Beispiel 10). Eine Vollblutprobe wurde mit einem monoklonalen Antikörper, dessen FVIII-Aktivität inhibierende Eigenschaften bekannt waren, inkubiert, um die Anwesenheit eines natürlich vorkommenden FVIII-Inhibitors (Antikörper gegen FVIII) zu simulieren. Diese Probe wurde verglichen mit der Vollblutproben-Kontrolle (Puffer anstelle von mAb). Die FEIB-Aktivität der Protease wurde durch Zusatz der Protease (Endkonzentration 17 µg/ml) zu der durch den mAb inhibierten Vollblutprobe getestet. Einer weiteren



Probe wurde Protease zugegeben und deren alleiniger Einfluss auf die r-Zeit ermittelt.

### Ergebnis

	r-Zeit	
Vollblut-Kontrolle	8,0	5
Vollblut + mAb	11,0	
Vollblut + mAb + Protease	8,0	
Vollblut + Protease	3,5	10

Die Verlängerung der r-Zeit, die durch den anti-FVIII-mAb verursacht wurde, wurde durch die Anwesenheit der Protease wieder normalisiert, was die FETB-Aktivität der Protease veranschaulichte. Die Protease allein bewirkte eine Verkürzung der Gerinnungszeit, wie schon oben gezeigt.

Die Ergebnisse sind in den Beispielen 12 und 13 enthalten.

### Beispiel 12

Einer Lösung, die 50 µg/ml der FVII-aktivierenden Protease enthält, wurden folgende Substanzen auf die entsprechenden Endkonzentrationen zugesetzt:

25 mM Na-Citrat  
25 mM HEPES  
100 mM Arginin  
0,75 g/ml Saccharose.

Die Lösung wurde portioniert und die Aliquots wurden jeweils auf unterschiedliche pH-Werte von 5,0 bis 8,6 eingestellt und anschließend für 10 Stunden bei 60°C erhitzt.

Die Aktivitäten der erhitzten Proteaselösungen wurden in einem chromogenen Test bestimmt, wobei die zeitabhängige Amidolyse des chromogenen Substrates S2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pHAX<sub>2</sub> HCL, Chromogenix AB, Schweden) registriert wurde. Diese Aktivität wurde als Prozent der parallel gemessenen, nicht erhitzten Aliquots ausgedrückt:

### Resultat

Ansatz	Aktivität (%)	
Ausgangsmaterial	100	
pH 5,0	76	35
pH 5,5	65	
pH 6,1	81	
pH 6,5	50	
pH 7,1	43	
pH 7,5	46	40
pH 8,1	46	
pH 8,6	32	

Diese Versuchsreihe verdeutlicht, dass die Stabilisierung besonders im saurem pH-Bereich die Inaktivierung der Protease deutlich reduziert hat. Der leichte "Einbruch" bei pH 5,5 läßt sich dadurch erklären, dass der isoelektrische Punkt der Protease in diesem Bereich liegt. Na-Citrat verhindert, dass ein Aktivitätsverlust >50% im bevorzugten pH-Bereich eintritt.

### Beispiel 13

Der Ansatz bei pH 6,1 (Beispiel 1) zeigte die beste Stabilisierung der Protease. Entsprechend wurden bei pH 6,0 verschiedene Zusätze getestet und entsprechend Beispiel 1 ausgewertet:

Folgende Endkonzentrationen wurden bei einer Konzentration der Protease von 50 µg/ml eingestellt:

50 mM Na-Citrat/50 mM NaCl, pH 6,0  
0,75 g/ml Saccharose  
100 mM Glycin  
100 mM Arginin

### Resultat

Ansatz	Aktivität (%)	
Ausgangsmaterial	100	
Na-Citrat/NaCl	54	
Na-Citrat/NaCl/Saccharose	85	65
Na-Citrat/NaCl/Saccharose/Glycin	92	
Na-Citrat/NaCl/Saccharose/Arginin	97	

Eine deutliche Stabilisierung der Protease durch Zusatz von Saccharose und jeweils einer Aminosäure wurde gezeigt.

# Patentansprüche

1. Protease zur Aktivierung des Blutgerinnungsfaktors VII, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie
  - a) durch die Abwesenheit von Aprotinin gehemmt wird,
  - b) durch Calcium-Ionen und/oder Heparin oder Heparin-verwandte Substanzen in ihrer Aktivität gesteigert wird und
  - c) in der SDS-PAGE bei anschließender Färbung im nicht-reduzierten Zustand eine oder mehrere Banden im Molekulargewichtsbereich von 50–75 kDa und im reduzierten Zustand eine Bande bei 40–55 kDa und eine oder mehrere Banden im Molekulargewichtsbereich von 10–35 kDa aufweist.
2. Protease nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in der SDS-PAGE im reduzierten Zustand im Molekulargewichtsbereich 60–65 kDa und von 40–55 kDa gewonnene Bande eine Aminosäuresequenz von LLESIDP und die im Molekulargewichtsbereich von 10–35 kDa gewonnene Bande eine Aminosäuresequenz von IYGGFK-STAGK aufweist.
3. Protease nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Fraktionierung von Blutplasma oder von Prothrombinkomplex(PPSB)-Konzentraten gewonnen wird.
4. Proenzym der Protease nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie in der SDS-PAGE im reduzierten Zustand eine Bande im Molekulargewichtsbereich zwischen 60 und 65 kDa aufweist und die Aminosäuresequenzen LLESIDP und IYGGFKSTAGK enthält.
5. Verfahren zur Gewinnung der Protease gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Blutplasma oder Prothrombinkomplex (PPSB)-Konzentraten nach vorangegangener Anionenaustauscher-Chromatographie mittels einer Affinitätschromatographie unter Verwendung von Heparin oder einer dem Heparin verwandten Substanz oder Dextransulfat gewonnen wird.
6. Reagenz zum immunologischen Nachweis der Protease der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es einen polyklonalen oder monoklonalen Antikörper gegen die Protease enthält.
7. Reagenz zum Nachweis von Faktor VII, dadurch gekennzeichnet, daß es die Protease der Ansprüche 1 bis 3, ggf. zusammen mit Protease-Aktivatoren enthält.
8. Testsystem zum qualitativen und quantitativen Nachweis einer Protease nach Anspruch 1 oder ihres Proenzyms nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Protease gemessen wird durch
  - a) ihre die Blutgerinnungsfaktoren VIII/VIIIa oder V/Va inaktivierende Wirkung oder
  - b) ihre die Blutgerinnungszeiten verkürzende Wirkung in globalen Gerinnungstests oder
  - c) ihre Plasminogen-Aktivatoren aktivierende Wirkung
  - d) ihre den FVII aktivierende Wirkung.
9. Testsystem nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die die Blutgerinnungszeiten verkürzende Wirkung bestimmt wird mittels der
  - a) nicht-aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (NAPTT) oder der
  - b) Prothrombinzeit (PT) oder der
  - c) Plasma-Rekalkifizierungszeit oder der
  - d) aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (APTT).
10. Testsystem nach Ansprüchen 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß die die Plasminogen-Aktivatoren aktivierende und/oder verstärkende Wirkung gemessen wird durch die Aktivierung der
  - a) Einketten-Urokinase (scuPA, single chain urokinase plasminogen activator) oder der
  - b) Einketten-tPA (scfPA, single chain tissue plasminogen activator).
11. Testsystem nach Ansprüchen 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es Kalziumionen in einer Menge von mehr als 0,001 mM, vorzugsweise in einer Menge von mehr als 0,005 mM, enthält.
12. Testsystem nach den Ansprüchen 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die die Plasminogen-Aktivatoren verstärkende Wirkung
  - a) mit einem chromogenen Test oder
  - b) in einer gekoppelten Reaktion in Anwesenheit von Plasminogen gemessen wird, wobei die Plasminbildung selbst oder die durch Plasmin bewirkte Auflösung eines Fibringerinnsels bestimmt wird.
13. Stabilisiertes Faktor V- und stabilisiertes Faktor VIII-Präparat, dadurch gekennzeichnet, daß sie von den durch proteolytischen Abbau entstehenden, inaktiven Faktor VII und Faktor V-Fragmenten durch die Inhibition der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease frei sind.
14. Stabilisiertes Präparat nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß zur Inhibition der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease die Konzentration an Kalziumionen im Faktor VIII oder im Faktor V-Präparat weniger als 1,0 mM, vorzugsweise weniger als 0,5 mM beträgt.
15. Stabilisiertes Präparat nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die FVIII- bzw. FV-haltige Lösung mit immobilisiertem Heparin, immobilisierten heparin-ähnlichen Substanzen oder immobilisiertem Dextransulfat in Kontakt gebracht und dadurch eine ganz oder teilweise von Protease/Proenzym befreite Lösung gewonnen worden ist.
16. Stabilisiertes Präparat nach den Ansprüchen 14 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß es gegen den proteolytischen Abbau durch die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease durch den Zusatz eines natürlichen oder synthetischen Protease-Inhibitors geschützt ist.
17. Stabilisierte Lösung der Protease oder des Proenzyms nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Zugabe eines Puffers auf einen pH-Wert auf 4,0 bis 9,0 eingestellt ist und/oder Ethylenglykol oder Glycerin in einer Menge von 5–80 Gew.-% enthält.
18. Pharmazeutische Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine zur Auflösung von fibrinhaltigen Throm-

- ben ausreichende Menge der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease und/oder ihr Proenzym enthält.
19. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass sie ausser der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease und/oder ihrem Proenzym Einketten- oder Zweiketten-Plasminogenaktivatoren (PA) und/oder Antikoagulantien enthält.
20. Pharmazeutische Zubereitung nach den Ansprüchen 18 und 19, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich lösliche Kalziumsalze und/oder Heparin oder heparin-ähnliche Substanzen enthält. 5
21. Pharmazeutische Zubereitung zur Verminderung der Gerinnungsfähigkeit des Blutes, dadurch gekennzeichnet, daß sie zur Inhibierung der Protease und/oder ihres Proenzym gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 einen Proteasehemmer wie Aprotinin enthält.
22. Verfahren zur Herstellung einer die Proenzym gemäß den Ansprüchen 1-4 enthaltenden pharmazeutischen Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass die Zubereitung 10
- a) in einem pH-Bereich von 3,5 bis 8,0
  - b) unter Zusatz einer oder mehrerer Aminosäuren in einer Menge von >0,01 mol/l und/oder
  - c) unter Zusatz eines Zuckers oder einer Kombination mehrerer Zucker in einer Gesamtmenge von > 0,05 g/ml und/oder 15
  - d) unter Zusatz einer oder mehrerer Substanzen, die Calcium-ionen zu komplexieren vermögen
- unter Pasteurierungs-Bedingungen hergestellt wird.
23. Pharmazeutische Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 22 erhältlich ist. 20
24. Verwendung der aus Blutplasma, Prothrombin-Komplex(PPSB)Konzentraten hergestellten oder rekombinant oder transgen exprimierten Protease oder ihres Proenzym gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 zur Förderung der Wundheilung und der Blutstillung, als Zusatz eines auf Fibrinbasis zum raschen Wundverschluß geeigneten Fibrinklebers, zur Substitution bei angeborenen oder erworbenen Mangelzuständen an dieser Protease oder ihrem Proenzym, beim Vorliegen von Antikörpern gegen den Blutgerinnungsfaktor VIII oder zur in vitro-Aktivierung von Faktor VII. 25

---

Hierzu 3 Scite(n) Zeichnungen

---

30

35

40

45

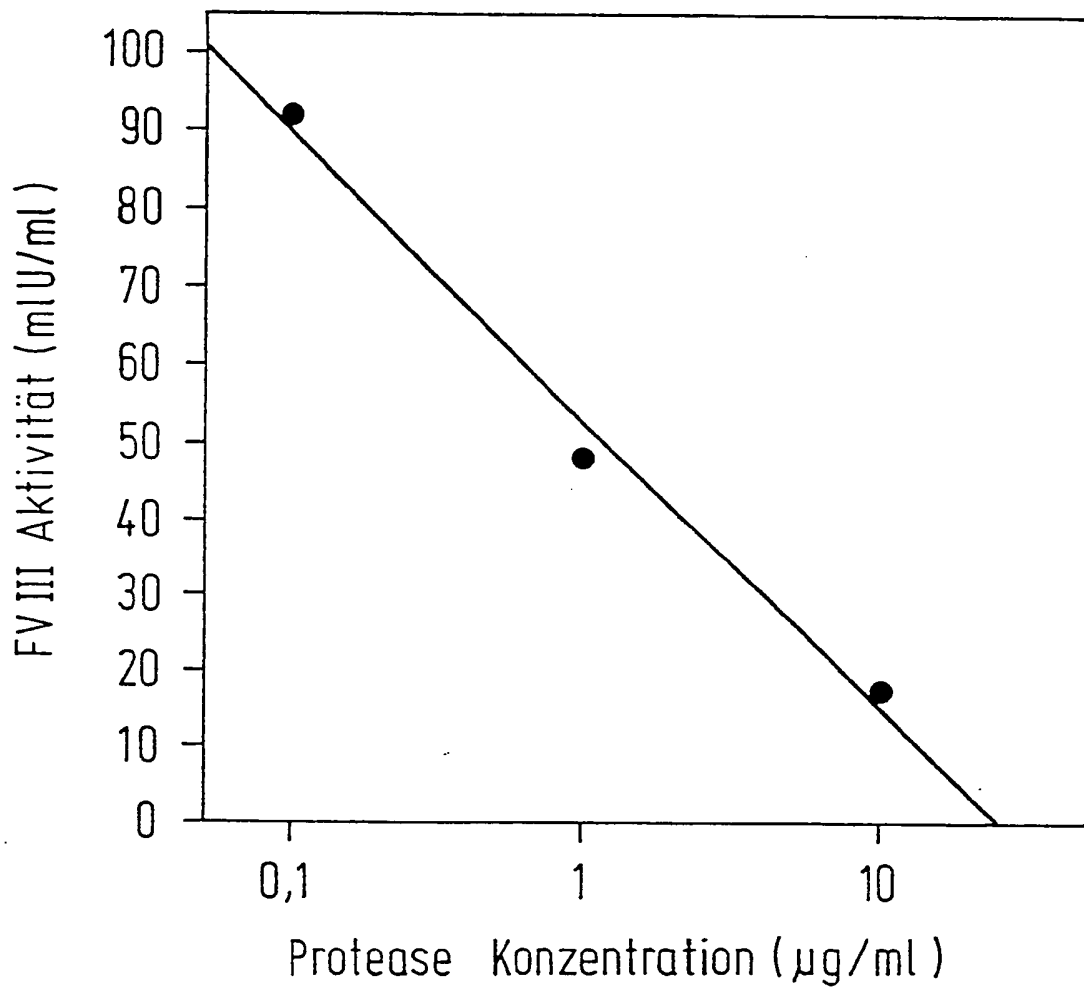
50

55

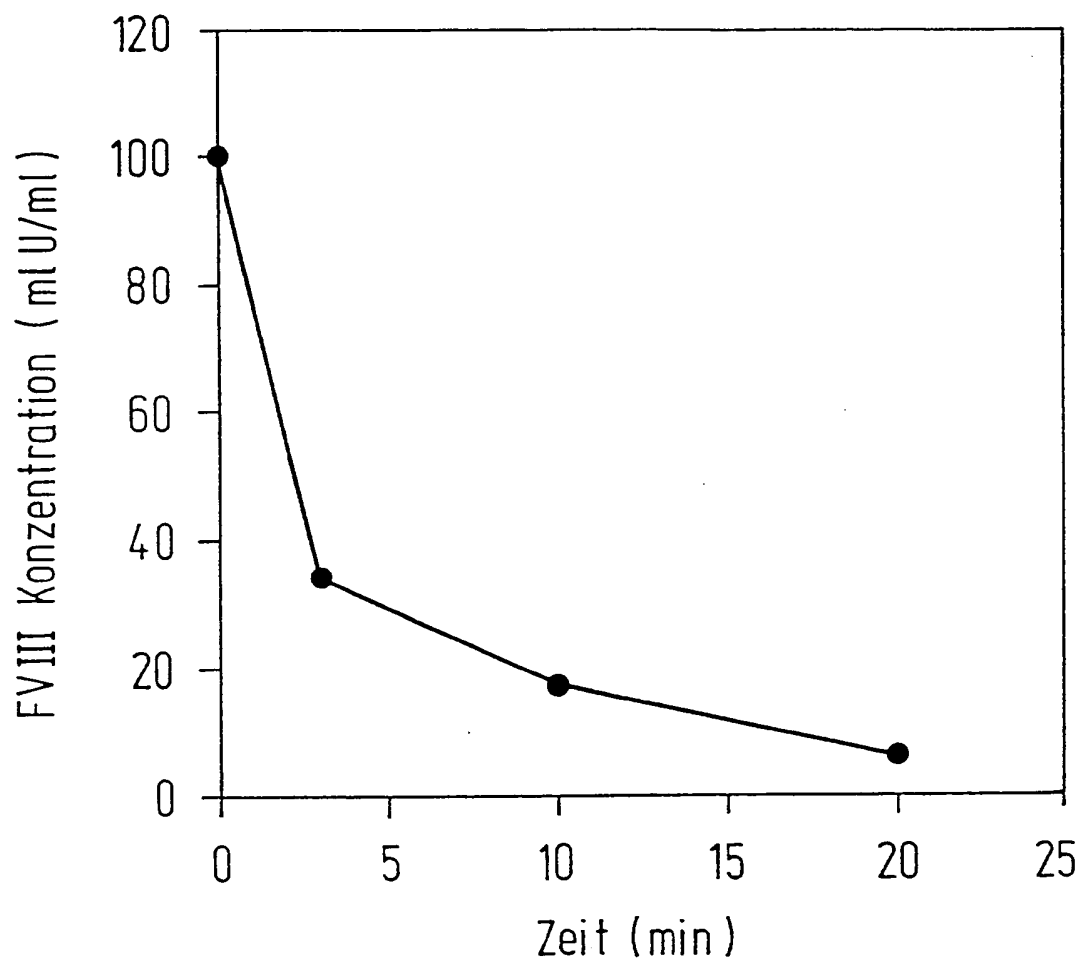
60

65

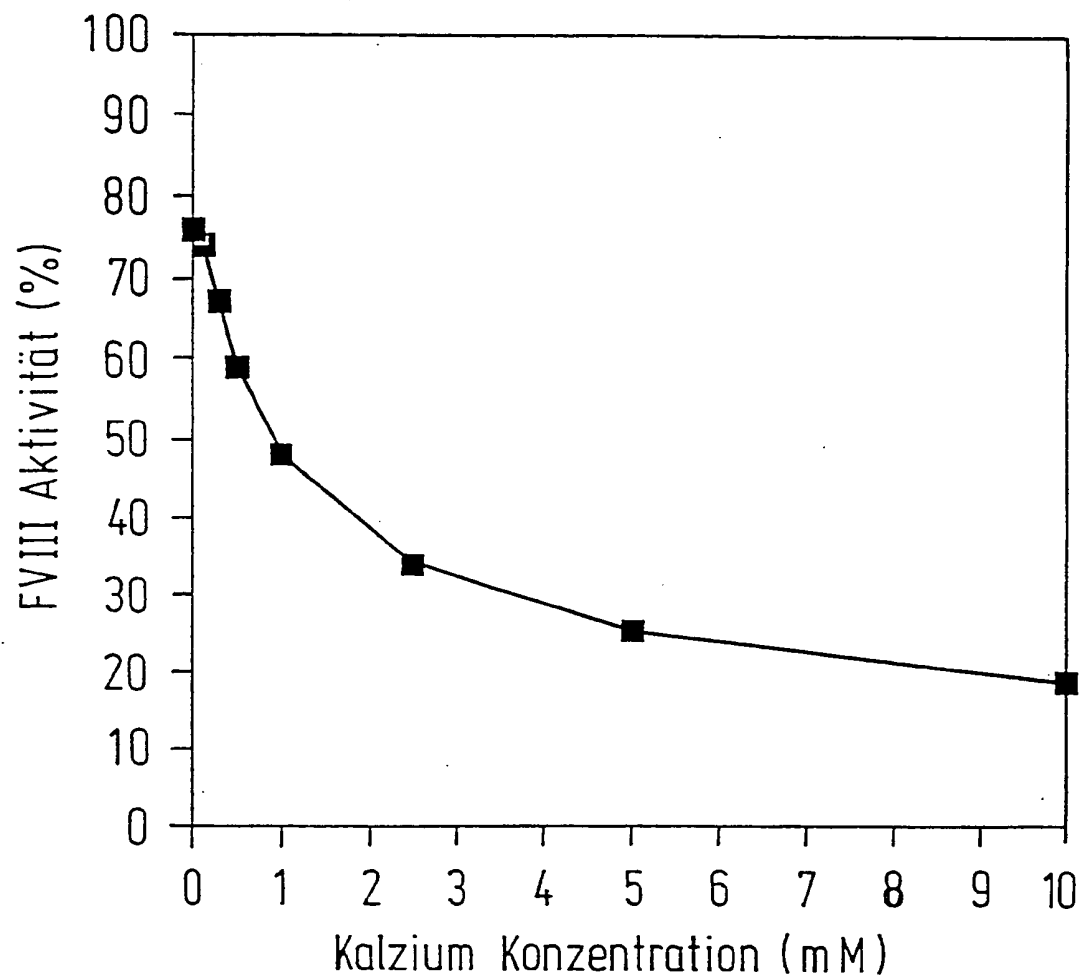
## Abbildung 1



## Abbildung 2



### Abbildung 3



### Protease for activating clotting factor VII

The invention relates to a protease for activating the blood clotting factor VII, to a process for isolating it, detecting it and inactivating it, and to medicinal preparations which comprise this protease.

The blood clotting system comprises two different, cascade-like pathways for activating clotting factors which are present in the plasma. The intrinsic or the extrinsic pathway is preferentially used for initiating clotting, depending on the triggering mechanism.

When a tissue is damaged, thromboplastin (tissue factor, TF with phospholipids) is exposed by the affected cells as the starter of the extrinsic clotting pathway. The membrane-located thromboplastin can bind both clotting factor VII (FVII) and circulating, activated FVII (FVIIa). In the presence of calcium ions and lipids, this TF-FVIIa complex leads to the binding of FX, which is converted into its activated form (FXa) by limited proteolysis. FXa in turn leads, by activating prothrombin to form thrombin, to the formation of fibrin and thereby ultimately to closure of the wound.

While the further activation of the thromboplastin-bound FVII initially takes place autocatalytically, in particular, it is supported, after the clotting cascade has been initiated, by FXa and thrombin, in particular, leading to marked reinforcement of the reaction cascade.

The administration of FVIIa or FVIIa-containing concentrates is indicated in certain clinical situations. The so-called FVIII-bypassing activity (FEIBA) of FVIIa is used in patients who are suffering, for example, from hemophilia A and have developed antibodies against FVIII as a consequence of the

administration of FVIII. According to presently available findings, FVIIa is well tolerated in this context and, while it does not lead to any tendency to thrombosis, it is suitable for ensuring that clotting takes place to a limited but adequate extent. Recombinant FVIIa is already being used therapeutically and prophylactically. FVII which has been isolated from blood plasma can also be activated and then used. Proteases such as thrombin can be used for this activation; however, these proteases, as such, can themselves strongly activate clotting and lead to the risk of a thrombosis. For this reason, subsequent removal or inactivation of thrombin is necessary and leads to yield losses. As a result of the risk of thrombosis which is associated with it, the use of FXa or FIIa (thrombin) is frequently contraindicated and only indicated in emergencies, e.g. in association with extreme loss of blood and unstaunchable hemorrhages.

FVIIa is found in very low concentrations in the plasma of healthy subjects. Only very little is so far known about the formation and origin of FVIIa which is circulating in the blood. Traces of thromboplastin which has been expressed or released in association with cell destruction might play a role in this context. Although it is known that factor XIIa, for example, can lead to FVII activation under certain conditions, the physiological relevance of this reaction has not yet been clarified.

Surprisingly, a FVII-activating protease, which differs from all the previously known proteases, has now been found in connection with fractionating human plasma and certain prothrombin complex concentrates. Investigations into this protease have shown that it exhibits a particularly high amidolytic activity toward the peptide substrate S2288 (HD-isoleucyl-L-prolyl-L-arginine-pNA) from Chromogenix AB, Sweden. A particular feature of this protease is that the amidolytic activity is efficiently inhibited by aprotinin. Other inhibitors, such as the antithrombin III/heparin complex, are also suitable for the inhibition. On the other hand, its activity is increased by heparin and heparin-related substances such as heparan sulfate or dextran sulfate and calcium ions. Finally, it has been found that



this protease is able, in a manner dependent on time and on its concentration, to convert FVII into FVIIa. This reaction, too, is inhibited by aprotinin.

Part of the subject matter of the invention is therefore a protease for activating the blood clotting factor VII, which

- a) is inhibited by the presence of aprotinin,
- b) is increased in its activity by calcium ions and/or heparin or heparin-related substances, and
- c) in SDS-PAGE, on subsequent staining in the non-reduced state, has one or more bands in the molecular weight range from 50 to 75 kDa and kDa in the reduced state has a band at 40 to 55 kDa and one or more bands in the molecular weight range from 10 to 35 kDa.

In the following text, the activated form of the protease is termed "protease" whereas the non-activated form is termed "proenzyme".

Further investigations with this protease have shown that, after enriching or isolation, it suffers from a rapid loss of activity, which was observed in a solution containing 20 mM tris, 0.15 M NaCl at a pH of 7.5. The addition of albumin at a concentration of 0.1% was not able to prevent the activity of the protease from decreasing by 50% after one hour at room temperature. On the other hand, very good stabilization of the protease was observed in a solution which was buffered to a pH of 6.5 with 50 mM Na citrate. If no particular stabilizers are added to the protease solution, no, or only slight, losses in activity are observed if the solution is adjusted to a pH of between 4 and 7.2, preferably to a pH of between 5.0 and 7.0. However, it is expedient to add stabilizers to the solution, with suitable stabilizers, apart from citrate, being, in particular, glutamate, amino acids, such as

arginine, glycine or lysine, calcium ions and sugars such as glucose, arabinose or mannose in quantities of 1-200 mmol/l, preferably in quantities of 5-100 mmol/l. Efficient stabilization was also achieved by adding glycols such as ethylene glycol or glycerol, with quantities of 5-80% by weight, preferably of 10-60% by weight, being used. The pH of the stabilized solution should then be between the pH values 4-9.

While the novel protease, and also the proenzyme, can be obtained by recombinant DNA methods or by production in e.g. the milk of suitable transgenic animals, they can in particular be obtained by fractionation of blood plasma or of prothrombin complex (PPSB) concentrates. The starting material is then first of all subjected to an anion exchange chromatography, which is followed by an affinity chromatography of the eluate. A heparin which is immobilized on a matrix, or a heparin-related substance such as heparan sulfate or dextran sulfate, is particularly suitable for the affinity chromatography. When such a chromatographic method is used, the novel protease and/or the proenzyme can be selectively bound and then eluted once again using known methods. The use of a spacer is advisable for coupling the ligand to the matrix. A heparin-lysine matrix has been found to be particularly suitable for isolating the novel protease.

In SDS-PAGE with subsequent staining, the protease which has been isolated by this method exhibits, in the non-reduced state, one to several bands which lie closely together in the molecular weight range of 55-75 kDa. Following reduction, one to several bands were observed in the molecular weight range of 15-35 kDa and one band was observed at 40-55 kDa. A further band between 60 and 65 kDa, which, after scanning and quantitative evaluation, constituted 5-10% of the total protein, showed that non-activated proenzyme was also present. This result was supported by appropriate investigations using monoclonal antibodies against this protease. It was therefore concluded that the proenzyme of this protease can also be prepared, pasteurized and used by the method according to

the invention. Part of the subject matter of the invention is therefore the proenzyme of the protease for activating blood clotting factor VII. The proportion of the proenzyme is indicated by the band between 60 and 65 kDa. Corresponding to the amino acid sequence which constitutes the activation region of the proenzyme, thrombin, kallikrein or FXIIa are, in accordance with their substrate specificities, examples of suitable physiological activators of the proenzyme.

Some of the properties of the novel protease which have been described, namely the fact that it can be isolated from plasma or from prothrombin complex (PPSB) concentrates which are derived from plasma, the inhibition of its amidolytic activity by aprotinin and the described migration behavior in SDS-PAGE, both in the reduced and in the non-reduced states, are reminiscent of a protease which was isolated by Hunfeld et al. (Ann. Hematol. 1997; 74: A87, 113; Ann. Hematol. 1998; 76: A101, P294 and Etscheid et al. Ann. Hematol. 1999, 78: A42) from a PPSB concentrate which was not defined in any more detail. In that case, the preparation was essentially achieved using an aprotinin matrix. As a result of the amidolytic cleavage of certain peptide substrates, the activity was described as being a thrombin-like activity. Hunfeld et al. did not find any influence on global clotting parameters such as prothrombin time, Quick or platelet aggregation.

The N-terminal sequencing of the protease described by Hunfeld et al. shows concordances with a protein whose cDNA was described by Choi-Miura et al. (J. Biochem. 119: 1157-1165 (1996)). In its primary structure, the corresponding protein exhibits homology with an enzyme termed hepatocyte growth factor activating enzyme (HGFA).

When two bands which were isolated from SDS-PAGE under reducing conditions were subjected to N-terminal sequencing, the following concordances were established:

<b>Molecular weight range of the band</b>	<b>Amino acid sequence</b>	<b>Author</b>
10-35 kDa	IYGGFKSTAGK	present invention
30 kDa	IYGGFKSTAG	Hunfeld et al.
17 kDa	IYGGFKSTAGKH	Choi-Miura et al.
40-55 kDa	LLESLDP	present invention
50 kDa	SLDP	Hunfeld et al.
50 kDa	SLLESLDPWTPD	Choi-Miura et al.

Concordances are also found in other test results such as substrate specificity and the ability of the activity to be inhibited. Despite this, it is still not possible at present to assume with confidence that these proteins are identical. At any rate, the previously investigated, abovementioned proteins have not been reported to possess the property of activating FVII or activating other factors (see below).

On the basis of its described properties, the novel protease can be used diagnostically and therapeutically.

#### **1. Test systems using the novel protease**

The novel protease can be used diagnostically in test reagents. Thus, the presence of factor VII can be determined qualitatively and quantitatively in a clotting test by adding the novel protease.

Conversely, the test system developed for measuring FVII activation can also be used for detecting and quantifying the protease. For this, a solution containing the protease is mixed with an FVII-containing solution and, after an appropriate incubation time, the resulting quantity of FVIIa is quantified. This can be carried out, for example, using the Staclot® FVIIa-rTF test (Stago/Boehringer Mannheim). When a preferred procedure is used, this test is not limited by the FVII concentration supplied. If the quantity of

protease in the form of the proportion of total protein is known, which proportion can be determined

- in a pure protease preparation, by means of the Kjeldahl method or by means of another protein assay with which the skilled person is familiar, or
- using an antigen test, for example based on specific antibodies and an appropriate immunochemical determination method such as ELISA, the specific activity of the protease preparation can then be measured in a corresponding manner.

Surprisingly, a property has now been found, in association with characterizing the protease further, which makes it possible to carry out an additional determination method. In association with incubation of the blood clotting factors VIII/VIIIa and V/Va with said protease, and subsequent quantification, it became clear that said clotting factors are inactivated in a manner which is dependent on the protease concentration and on the length of the incubation.

Another part of the subject matter of the invention is therefore a novel test system for qualitatively and quantitatively detecting the protease which activates blood clotting factor VII, in which system the protease can be determined by its action inactivating the blood clotting factors VIII/VIIIa or V/Va. This test system is based on a solution containing the protease being incubated with factor VIII/VIIIa or factor V/Va and the remaining quantity of factor VIII/VIIIa or the remaining quantity of factor V/Va being measured by means of a conventional activity test and the amount of protease then being quantitatively determined from this by comparison with a standard curve. In carrying out this test, the incubation of the protease activity is inhibited, after predetermined periods of time, by the limited addition of aprotinin, which has the advantage that it has no effect, at these concentrations, on the subsequent measurements of the test

system. After that, the remaining activities of the clotting factors are measured by means of a test which is familiar to the skilled person. For this, a test system has, in particular, proved its worth in which use is made of the so-called Coamatic<sup>®</sup> factor VIII test (Chromogenix AB), which essentially contains factors IXa and X, with the resulting amount of FXa being quantified, in the presence of a thrombin inhibitor, by means of the conversion of a chromogenic substrate (see last third of page 2). This amount is in turn proportional to the quantity of FVIII or FVIIIa. Determining the residual FVIII activity then makes it possible to deduce the concentration of protease which is present.

The degradation of the FVIII/FVIIIa or the FV/FVa due to the proteolytic effect can be clearly demonstrated by SDS-PAGE. Depending on the time for which the protease is incubated, for example, with an FVIII concentrate, bands which are typical for FVIII disappear while other, new bands emerge or weak bands increase in intensity. Accordingly, the activity of the protease can also be correlated by quantifying the decreasing or increasing bands and consequently measured quantitatively, for example using a protease standard. The changes in the band intensities on the SDS-PAGE electropherogram or following other electrophoretic methods can be quantified, for example, using a scanner, with which a skilled person is familiar, and the appropriate program. In addition to this, antibodies against said clotting factors can be used for Western blotting and employed for evaluation in the manner described. Antibodies which specifically detect the decreasing bands or, in particular, the emerging bands are particularly suitable. In this context, these antibodies can also be used for establishing other immunochemical tests such as an ELISA.

The proteolytic inactivation which has been described in the case of FVIII/FVIIIa is also observed when the protease is incubated with factor V/Va, which exhibits a certain degree of structural homology with FVIII. The degradation can be monitored in suitable activity test systems and in SDS-PAGE/Western blotting.

Despite the inactivations of FV and FVIII, it was now found that adding the protease to blood, to platelet-rich plasma or plasma shortened the clotting times, that is the procoagulatory effect predominated in various so-called "global clotting tests". These test systems are understood as being, for example, the non-activated partial thromboplastin time (NAPTT), the prothrombin time (PT) and the recalcification time. Since the shortening of these times, as measured, for example, in so-called coagulometers, by means of thromboelastography or else in chromogenic tests, correlates with the concentration of a clotting-promoting substance, the concentration of the substance in a sample can conversely be deduced using a calibration curve of the clotting time. The concentration of the "FVII activator" can correspondingly be determined using selected global clotting tests.

It was also surprising to find that the "FVII activator" is likewise able to bring about effective activation of single chain urokinase (scuPA, single chain urokinase plasminogen activator) and single chain tPA (sctPA, single chain tissue plasminogen activator), that is can act as a plasminogen activator activator (PAA). The activity of the activated PAs can be measured, for example, using chromogenic substrates. Accordingly, this property can therefore also be used for detecting and quantifying the "FVII activator". The activation of the plasminogen activators can also be determined in a coupled reaction in the presence of plasminogen, either by the formation of plasmin itself or by the dissolution of a fibrin clot which is brought about by plasmin.

In summary, therefore, it can be stated that the protease can be both detected and quantified by incubating it with a solution containing FVIII or FVIIIa and then determining the remaining quantity of FVIII/VIIIa by means of a suitable activity test. In the same way, FV or FVa can be incubated with the protease and the remaining quantity of FV/FVa can subsequently be quantified. The unknown protease concentration can be determined

quantitatively by comparison with a standard curve of increasing quantities of protease which is included in the test. Various global clotting tests are likewise suitable for the quantification, with the protease concentration being read off a calibration curve on the basis of the shortening of the clotting time. The PAA activity of the protease can also be used for determination purposes.

Another feature of these tests is that the FV and FVIII inactivation and the PAA activity are displayed particularly well in the presence of adequately high concentrations of calcium, preferably  $> 0.001$  mM, particularly preferably  $> 0.005$  mM, e.g. in the form of  $\text{CaCl}_2$ . In contrast to the direct chromogenic assay, in which, as has been described above, both heparin and heparin-like substances and also calcium increase the protease activity, the inactivation of FV/FVIII is not promoted, or only promoted insignificantly, by heparin. By contrast, the PAA activity is stimulated in the presence of both agents, that is by calcium and/or heparin or heparin-like substances.

The protease-mediated reactions can be very efficiently diminished or prevented by incubating the protease with inhibitors, particularly antithrombin III in the presence of heparin or heparin-like substances (preferably in the presence of heparin), C1-esterase inhibitor, alpha2-antiplasmin, inter-alpha-trypsin inhibitor or known synthetic, low molecular weight protease inhibitors such as Guanidinocaproic acid-para-ethoxy-carbonylphenylester which is available under the trademark FOY®. These substances can therefore be used for stopping the reaction, in order, for example, to define incubation times precisely or to increase the specificity of the test still further. Decreasing the free calcium ions in the mixture with a chelating agent, for example, can also be used for this purpose.



## 2. Stabilized preparations of factor V and factor VIII

The further task now ensued, from the above-described observations concerning the proteolytic actions of the novel protease on clotting factors V and VIII, of inhibiting the protease or reducing its activity in order to avoid losses of yield and the formation of what might possibly be interfering protein fragments. This is all the more relevant since FV and FVIII are usually prepared from cryoprecipitates which have been obtained from plasma and in the presence of calcium ions because the latter are required for maintaining protein conformations.

Another part of the subject matter of the invention is therefore a stabilized preparation of FV or FVIII which is free of the factor V or factor VIII fragments formed due to proteolytic degradation as a result of the fact that the protease activating the blood clotting factor VII is inhibited. Since more detailed investigations have shown that inactivation of factor V and factor VIII by said protease takes place particularly efficiently in the presence of calcium ion concentrations greater than 0.5 mM, the factor V or VIII preparation can be effectively stabilized if, for the inhibition of the protease activating the blood clotting factor VII, the concentrations of calcium ions in the factor V or in the factor VIII preparation are adjusted to less than 1.0 mM, preferably to less than 0.5 mM. While the factor V- and factor VIII-inactivating properties of the protease are markedly reduced at these concentrations, the quantity of calcium ions is still sufficient for stabilizing the conformations of the FV and FVIII molecules. The abovementioned quantities of calcium ions should not be exceeded, not merely in the end product but also in the cryoprecipitate itself and in the following purification steps.

In accordance with the above-described affinity of the protease or the proenzyme for heparin and heparin-like substances, the protease/the proenzyme can be removed from the FVIII- or FV-containing solution by incubating with immobilized heparin or other suitable immune- or affinity-

adsorbents. Polyclonal or monoclonal antibodies, respective antibody-fragments that are useful in preparing the immune adsorbents are readily available by techniques known in the art in using all or part of the protease or proenzyme as antigen.

However, natural or synthetic protease inhibitors can also be employed, where appropriate in addition to decreasing the quantity of calcium ions, for preventing the proteolytic degradation of the FV or the FVIII. Proteins such as aprotinin, alpha2-antiplasmin, C1-esterase inhibitor or inter-trypsin inhibitor may be employed as inhibitors. Low molecular weight substances which are known to the skilled person as synthetic serine protease inhibitors can also be used in this context. Inhibitors, such as antithrombin III, whose inhibitory potential is increased by heparin or heparinoids can likewise be added. Thus, it has been found, surprisingly, that while heparin on its own is able to increase the amidolytic activity of the protease towards small chromogenic substances, it does not support inactivation of FV/FVIII.

### 3. Pharmaceuticals which comprise the novel protease

The novel protease and/or its proenzyme can also be used therapeutically.

They can be employed as a blood coagulating agent, either on their own or together with substances which increase the activity of the protease, such as heparin, or heparin-related substances, such as heparan sulfate, and/or calcium ions, with it being possible additionally to add factor VII as well, in its inactive form, to this agent. The use of such an agent, in which its FVIII-bypassing activity (FEIBA) is exploited, for example, can be indicated when intolerances exist toward FVIII and/or FIX and/or FXI and/or the contact phase proteins, such as FXII, for example on account of the presence of antibodies, or when other types of deficiency situation exist. In this connection, the FVII can be activated either in vitro, in the plasma, in enriched fractions or by acting on purified FVII. It is also possible to use

the novel blood coagulating agent *ex vivo* for general hemorrhage prophylaxis or for staunching hemorrhages.

On the other hand, the observed inhibition of the novel protease by aprotinin or the abovementioned inhibitors can be used for developing an agent which comprises a protease inhibitor and which diminishes the ability of the blood to coagulate. In addition to this, the novel protease can also be used to identify physiological or non-physiological factors, such as synthetic peptides, which impair blood clotting because of their protease-inhibiting effect. The peptide sequences of the chromogenic substrates which are transformed particularly efficiently, such as those of the S 2288 (see above for details), can be used as a structural basis for this. The addition of suitable inhibitors to clotting preparations, or during their preparation, can be necessary if these preparations are to be free of proteolytic activities.

Surprisingly, a property has now been found, in association with characterizing the protease further, which opens up the possibility of an additional use for the so-called "factor VII activator" protease. When single chain plasminogen activators such as prourokinase (single chain urokinase, scuPA, single chain urokinase plasminogen activator) or sctPA (single chain tissue plasminogen activator) are incubated, the "factor VII activator" brings about activation of these plasminogen activators (PA). In this connection, there is a limited proteolysis of the single chain PAs, resulting in the formation of double chain proteases, which are particularly suitable for activating plasminogen. The resulting plasmin is the effector of fibrinolysis, that is the physiological system which is responsible for dissolving thrombi. PAs, such as prourokinase or tPA, are endogenous proteins which are released when needed and which, as is known, are activated by plasmin or by kallikrein (scuPA). The mechanism by which scuPA is activated in the healthy state has not yet been fully clarified.

The plasminogen activators are employed therapeutically, as isolated or recombinantly prepared proteins, in pharmaceutical preparations in association with thromboembolic diseases or complications, such as in leg vein thrombosis, cardiac infarction or strokes.

In accordance with the properties of the "factor VII activator" which have now been found, the latter can be used for in vivo or ex vivo activation of plasminogen activators such as prourokinase or sctPA. This activity can also be applied by using said protease for the prophylaxis or therapy of thromboembolic diseases, specifically in combination with single chain or double chain plasminogen activators or anticoagulants as well. This possible use is not contradictory to the fact that the protease is also able to act in a procoagulatory manner. The question of which of the two reactions predominates is probably resolved by the availability of the physiological substrates. According to the current state of knowledge, factor VII is activated moderately in plasma and continuously maintains a certain concentration of FVIIa in order to be able to counteract immediately any sudden vascular damage. On the other hand, only nanogram quantities of tissue plasminogen activator and urokinase plasminogen activator are present in a milliliter of blood plasma. It is only when fibrin deposition or thrombi occur that there is an increase in the concentration, by secretion or synthesis, of plasminogen activators, which then display their thrombolytic activity by activating plasminogen after they have been activated locally, in particular when bound to the thrombus. When single-chain PAs are present, particularly in a locally restricted manner, their activation might outweigh FVII activation, thereby making it possible to adjust to the physiological situation. Accordingly, this protease might also regulate hemostasis, thereby indicating a replacement with the protease and/or the proenzyme in the case of inborn and acquired deficiency states.

Another part of the subject matter of the invention is therefore a pharmaceutical preparation which comprises a quantity of the blood clotting factor VII-activating protease and/or its proenzyme form which is

sufficient for dissolving fibrin-containing thrombi. This preparation may additionally comprise single chain plasminogen activators (PA) and/or anticoagulants. When the proenzyme is present it is advantageous to comprise a suitable activating agent within or together with the pharmaceutical preparation above.

Since it has been found that the plasminogen activator-reinforcing effect of the "FVII activator" is particularly promoted by calcium and/or heparin and heparin-like substances such as dextran sulfate, pharmaceutical preparations which additionally comprise soluble calcium salts and/or heparin or heparin-like substances may particularly advantageously be employed for dissolving, in accordance with the invention, fibrin-containing thrombi. In this context, the protease/proenzyme can be employed on its own or in combination with single chain or double chain plasminogen activators with or without substances which exhibit particular affinities for the protease and thereby increase its activity as carrier substances for prolonging plasma half life or as mediators to surfaces.

Pharmaceutical preparations which comprise the blood clotting factor VII-activating protease can, because of its special fibrinolytic effect, be employed for treating diseases which are caused by fibrin-containing thrombi. Fibrinolytic processes are also involved in wound healing processes. In this connection, said protease and/or proenzyme can be administered intravenously or locally, subcutaneously, intradermally or intramuscularly, or else topically in the case of injuries and wounds, or bound to a suitable carrier matrix. Both protease/proenzyme which has been isolated from body fluids such as blood or plasma and protease/proenzyme which has been prepared recombinantly or transgenically can be employed in this context. The protease/proenzyme is also suitable for use as a component of a so-called fibrin adhesive, which should not then contain any substance, such as aprotinin, which inhibits the protease/proenzyme. In this case, use can be made of the clotting-shortening properties of the protease.

The protease/proenzyme above may be used for inherited or acquired hemostasis deficiencies, in (diffuse) bleeding occurrences respective thrombosis associated complications. If used to treat bleeding the combination of protease/proenzyme together with F VIII optionally under addition of further clotting factors is advantageous.

#### **4. Process for pasteurizing the FVII-activating protease**

As a protein which has been isolated from human plasma, the novel protease and/or its proenzyme can only be employed as a pharmaceutical preparation if it has previously been subjected to a process for inactivating viruses. The pasteurization process is in particular recognized as being the most important process for inactivating viruses. However, heating at about 60°C for up to 10 hours requires the protein which is to be treated to be of adequate stability. The optimal stabilizers have to be determined separately for each protein and their concentrations have to be optimized.

In the case of the novel protease and/or its proenzyme, conditions which stabilize the protein in solution, without any pasteurization being performed, have already been mentioned above. In this regard, a slightly acidic pH range has in particular proved to be advantageous. However, when a pasteurization is carried out under these conditions, the novel protease and/or its proenzyme as a rule loses more than 50% of its original activity.

It has now been found that a pasteurization of a pharmaceutical preparation comprising the novel protease and/or its proenzyme ensures optimal stabilization results if the preparation is prepared

- a) in a pH range of from 3.5 to 8.0, preferably in a pH range of from 4.0 to 6.8;
- b) in the added presence of one or more amino acids in a quantity of more than 0.01 mol/l, preferably more than 0.05 mol/l; and/or

- c) in the added presence of a sugar or of a combination of different sugars having a total concentration of more than 0.05 g/ml, preferably more than 0.2 g/ml; and/or
- d) in the added presence of one or more substances which are able to complex calcium ions, such as citrate, oxalate, ethylenediamine tetraacetic acid, etc.

Additives such as albumin, Haemaccel®, heparin and heparinoids, glycerol, glycol and polyethylene glycol, may also be used separately or mixed together. After the pasteurization has been completed, the sugars, amino acids and other additives which have been added as stabilizers can be decreased, or removed completely from the preparation, using methods with which the skilled person is familiar. The results of the pasteurization processes are given in Examples 12 and 13.

### Example 1

The Staclot® FVIIa-rTF test system (Stago/Boehringer Mannheim) was used for demonstrating activation of FVII by the prepared protease. This detection system is based on the particular property of (recombinant) soluble tissue factor (rTF) which is only able to use the preformed activated FVII (FVIIa) for initiating the extrinsic clotting pathway. In contrast to the situation when complete tissue factor is used, this makes it possible to determine the real content of FVIIa precisely.

Isolated FVII (Enzyme Research Labs) was used for the activation experiments. This FVII itself contains traces of FVIIa since it is isolated from human plasma. The concentration was adjusted to 0.05 IU of FVII/ml by diluting with buffer. The FVII was incubated at room temperature for 10 min with the test substances and then tested for the true FVIIa content. The FVIIa contents were quantified using a reference curve which was constructed in parallel.

It was ascertained in preliminary experiments, which are not described here, that while, in the concentration employed, aprotinin completely inhibited the activity of the prepared protease, it had no direct effect on the FVIIa nor any significant effect on the FVIIa-rTF test system.

The results given below relate in each case to triplicate determinations.

The following experimental assays were accordingly set up:



1. FVII:

Result: 10 mIU of FVIIa/ml

Non-activated FVII was used as the control assay. This already contains traces of FVIIa (see above) in the order of magnitude of 10 mIU of FVIIa/ml.

2. FVII + aprotinin:

In this assay, FVII was incubated in the presence of aprotinin and used in the FVIIa-rTF assay in order to demonstrate that FVIIa itself was not inhibited, and nor was the test affected by the aprotinin employed. This was confirmed (in comparison with assay 1).

3. Protease + FVII (incubation), followed by the addition of aprotinin:

Result: 18 mIU of FVIIa/ml

In this case, the protease was given time to activate FVIIa. Aprotinin was only added, in order to inhibit the protease, after the 10-minute incubation had taken place. The resulting FVIIa was quantified in the FVIIa-rTF assay. Subtracting the FVIIa base value (assay 1), 8 mIU of FVIIa/ml have therefore been formed by the action of the protease under the chosen conditions.

4. Protease + aprotinin, followed by the addition of FVII

Result: 11 mIU of FVIIa/ml

In this assay, the protease was inhibited with aprotinin before contact with FVII. Neither the subsequent incubation with FVII, nor the following FVIIa

quantification led to any significant increase in the FVIIa content (because of the range of variation in the assay, 11 versus 10 mIU/ml in assay 1 is not to be regarded as being significant).

## 5. Protease

**Result: 0 mIU of FVIIa/ml**

This assay demonstrated that, at the concentration selected, the protease did not itself have any effect on the FVIIa-rTF test system.

In summary, it follows from the above that

- the described protease activates FVII;
- the activation of FVII by the protease takes place "directly", that is independently of the presence of rTF;
- the activation of FVII can be inhibited by aprotinin; at the concentration selected, aprotinin itself does not have any significant influence on the test system.

## Example 2

This example describes how FVII is activated in a reaction which is dependent on the concentration of the protease and on the time over which the protease is incubated with FVII.

Test systems and reagents were selected to correspond with the conditions described in Example 1. In a first series of experiments, the initially introduced FVII was preincubated with different dilutions (1:5, 1:10 and 1:20) of the protease-containing solutions (5 min at RT), then treated

with aprotinin (to inhibit the protease) and subsequently tested for its content of FVIIa in the FVIIa-rTF assay.

Once again, the parallel assays, in which the protease had been inhibited by aprotinin before contact with FVII, served as control assays.

The results are given as activation factors, i.e. correspond to x times the value which was measured in the abovementioned control assay:

Assay	Control	
Protease + FVII	Protease + aprotinin	
Incubation	Incubation	
+ Aprotinin	+ FVII	
	Activation factor	
Dilution of the protease solution		
1:5	2.6	1.0
1:10	2.0	1.0
1:20	1.6	1.0

The activation factor 1:0 of the control assays corresponds to the control, which was additionally included and in which only the test buffer, containing the FVII employed, was treated under identical incubation conditions and tested. That is, no significant activation took place in the control assays.

It follows from this that FVII is activated by the protease in a manner which is dependent on the concentration of the protease.

It was similarly demonstrated that, when the concentrations of the coreactants are kept constant, the FVII is activated by the protease in a manner which is dependent on the length of the incubation.

When equal volumes of a solution containing 0.2 IU of FVII/ml and a 1:10-diluted protease solution were incubated together, the following contents of FVIIa were obtained after incubating for the relevant times and subsequently adding aprotinin (in order to stop the activation):

	Activation factor
Length of incubation	
0 min	1.0
2.5 min	1.3
5.0 min	2.0
10.0 min	2.8
40.0 min	> 3.8

It follows from this that FVII is activated by the protease in a time-dependent manner.

### Example 3

Using this example, it will be demonstrated that activation of FVII by the protease is increased in the presence of calcium ions and heparin.

25 µl of the protease-containing solution were mixed with 50 µl of

- buffer (control)
- 15 mM CaCl<sub>2</sub>
- 50 USP units of heparin/ml
- Pathromtin (lipid mixture, aliquot dissolved in accordance with the manufacturer's instructions)

at room temperature for 5 min, and then treated with 150  $\mu$ l of a tris/NaCl buffer solution (pH 8.2) and 25  $\mu$ l of the chromogenic substrate S2288 (3 mM); the time-dependent change in the extinction at 405 nm was then measured (at 37°C). The activation factors, related to the buffer control (x times), are given in the following table.

Assays	Activation factor (x times buffer control)
Buffer control	1.0
+ CaCl <sub>2</sub>	3.6
+ Heparin	2.6
+ Lipid	0.9
+ CaCl <sub>2</sub> + heparin	4.3
+ CaCl <sub>2</sub> + lipid	3.3
+ Heparin + lipid	2.7
+ CaCl <sub>2</sub> + heparin + lipid	3.7

Under the conditions used in this example, marked increases in the activity of the protease can be observed in the presence of calcium ions and/or heparin.

#### Example 4

In each case, 25  $\mu$ l of a solution, containing 10, 1 or 0.1  $\mu$ g of protease/ml, were mixed with 25  $\mu$ l of FVIII (2 IU/ml), after which 25  $\mu$ l of CaCl<sub>2</sub> (25 mM) and 25  $\mu$ l of Pathromtin® (Dade Behring GmbH) were added. After incubating at 37°C for 0, 3, 10 and 20 min, the reaction was stopped by adding 400  $\mu$ l of aprotinin (500 KIU/mg). A sample in which aprotinin was introduced initially served as a control.

Each sample was diluted in tris-buffer/BSA. In each case, 50  $\mu$ l of this solution were mixed with 50  $\mu$ l of the factor reagent (essentially composed of FIXa, FX and a thrombin inhibitor, appropriately modified in accordance with the Coamatic® FVIII test, Chromogenix AB) and incubated at 37°C for 10 min. After 50  $\mu$ l of substrate (e.g. S 2765, N-a-Cbo-D-Arg-Gly-Arg-pNA) had been added, the reaction was stopped after a predetermined period of incubation by adding 50  $\mu$ l of acetic acid (50%), and the OD405nm was then measured. A standard curve for FVIII was used for determining the concentration in the sample.

### **Results:**

In a first assay, the time for which the protease was incubated with FVIII (2 IU/ml) was kept constant (10 min) but the concentration of the protease was varied (0.1, 1 and 10  $\mu$ g/ml). The reaction was stopped and the residual concentration of active FVIII was determined. As the protease concentration increased, correspondingly more FVIII was inactivated (Figure 1).

The protease content of a sample can be quantified using an appropriate standard curve.

In a second assay, the concentration of the protease was kept constant (10  $\mu$ g/ml) but the time of incubation with FVIII (2 IU/ml) was varied. A marked reduction in the residual concentration of active FVIII was seen as the length of incubation increased (Figure 2).

### **Example 5**

The influence of the "FVII activator" on the activity of factor V was investigated:

25 µl of protease-containing solution (0-100 µg/ml) were incubated with 50 µl of FV (5 IU/ml) and 25 µl of 25 mM CaCl<sub>2</sub> (0-20 min) and, after that, 400 µl of buffer containing 100 KIU of aprotinin/ml were added.

In each case, 100 µl of each incubation assay were then incubated with 100 µl of FV-deficient plasma at 37°C for 1 min, after which 200 µl of Thromborel S® were mixed in and the clotting times were determined in a Schnitger and Gross coagulometer. The residual activities of FV were determined.

#### Results:

Protease concentration (µg/ml)	Residual FV activity		
	Time for which protease incubated with FV (min)		
	0	10	20
10	93	91	100
30	100	93	28
100	100	29	13

This example demonstrates that FV was inactivated by the protease over time.

#### Example 6

The influence of the "FVII activator" on clotting times in so-called global tests was investigated using Schnitger and Gross coagulometers. All the difference values listed correspond to the clotting times which were shortened by this amount.

NAPTT (non-activated partial thromboplastin time)

The protease-containing solution was diluted with buffer down to 100, 30, 10 and 3 µg/ml. 100 µl of each of these solutions were incubated, at 37°C for 2 min, with 100 µl of citrate plasma (standard human plasma pool or individual donors) and 100 µl of Pathromtin®, after which 100 µl of 25 mM CaCl<sub>2</sub> were added; the clotting times were then determined. The differences between these measured values and the corresponding clotting times obtained with buffer solution instead of the protease were determined.

Sample No.	Clotting time differences (buffer minus sample) (sec)				
	Protease concentration (µg/ml)				
	0	3	10	30	100
Standard human plasma (213 sec)	0	13	20	42	43
1	0	20	33	42	41
2	0	27	31	45	47
3	0	13	14	23	29
4	0	18	37	51	50
5	0	25	49	54	46

The addition of FVII-activator resulted in a concentration dependent shortening of NAPTT.



### Plasma recalcification time

The protease-containing solution was diluted with buffer down to 100, 30, 10 and 3 µg/ml. 100 µl of each of these solutions were incubated with 100 µl of citrate plasma (standard human plasma pool or individual donors) at 37°C for 1 min, after which 100 µl of 25 mM CaCl<sub>2</sub> were added; the clotting times were then determined. The differences between these measured values and the corresponding clotting times obtained with buffer solution instead of protease were determined.

Sample No.	Clotting time differences (buffer minus sample) (sec)				
	Protease concentration (µg/ml)				
	0	3	10	30	100
Standard human plasma (283 sec)	0	17.2	15.1	30.5	50.4
1	0	29.8	51.7	60.3	90.1
2	0	25.2	51.7	69.5	101.3
3	0	28.0	—	39.0	74.6
4	0	27.3	42.7	55.6	91.8
5	0	44.3	69.1	101.2	134.2

### PT (prothombin time)

The protease-containing solution was diluted with buffer down to 100, 30, 10 and 3 µg/ml. 100 µl of each of these solutions were incubated with 100 µl of citrate plasma (standard human plasma pool or individual donors) at 37°C for 1 min, after which 200 µl of Thromborel S (Dade Behring GmbH) were added; the clotting times were then determined.

The differences between these measured values and the corresponding clotting times obtained with buffer solution instead of protease were determined.

Sample No.	Clotting time differences (buffer minus sample) (sec)				
	Protease concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	0	3	10	30	100
Standard human plasma (13.6 sec)	0	1.0	1.7	1.5	2.4
1	0	0.7	1.3	2.4	2.7
2	0	0.3	0.4	1.7	3.1
3	0	0.4	0.7	1.5	1.8
4	0	0.1	0.7	1.8	3.1
5	0	0.3	0.5	1.2	2.8

The clotting times in the above global tests were shortened in a manner which was dependent on the concentration of the protease. In a corresponding manner, it was possible, after "calibrating" a plasma which was used with a known quantity of the "FVII activator", to determine the protease concentration in a sample by reading off from a standard curve.

#### Example 7

The plasminogen activator-activating properties of the "FVII activator" were investigated using single chain urokinase (scuPA) and single chain tPA (sctPA).

Assay:

0.1 ml of PA solution (20  $\mu$ g of scuPA/ml or 100  $\mu$ g of sctPA/ml)  
+ 0.1 ml of test buffer or  
100 U of heparin/ml in test buffer or  
20 mM  $\text{CaCl}_2$  in the test buffer  
+ 0.5 ml of test buffer  
+ 0.1 ml of protease/sample (increasing concentrations:  
2-10  $\mu$ g of scuPA/ml or  
50-200  $\mu$ g of sctPA/ml)

Incubation at 37°C

+ 0.1 ml of 100 KIU of aprotinin/ml in test buffer

Incubation at 37°C for 2 min

+ 0.1 ml of substrate S-2444 (3 mM)

As a control, aprotinin was introduced initially, instead of the plasminogen activator (PA), prior to the first incubation, and carried through in each case. In return, PA was not added until later, in place of the aprotinin.

The Difference of the measurements ( $\Delta$ )  $\Delta\text{OD}_{405\text{nm}}$  was determined photometrically. The control values which were obtained were subtracted from the sample/protease values and in this way the PA activity which was caused by the PAA activity was determined (in mIU/min).

### Results:

scuPA activation (20  $\mu$ g of scuPA/ml, 2-10  $\mu$ g of "FVII activator"/ml)

A. Stimulant: none

Incubation time (min)	Resulting PA activity ( $\Delta$ mIU/min)		
	"FVII activator" ( $\mu$ g/ml)		
	2	5	10
2	25	60	117
5	79	179	165
10	186	449	517

B. Stimulant: heparin

Incubation time (min)	Resulting PA activity ( $\Delta$ mIU/min)		
	"FVII activator" ( $\mu$ g/ml)		
	2	5	10
2	190	332	425
5	330	455	458
10	417	462	460

C. Stimulant:  $\text{CaCl}_2$

Incubation time (min)	Resulting PA activity ( $\Delta$ mIU/min)		
	"FVII activator" ( $\mu$ g/ml)		
	2	5	10
2	255	370	401
5	338	424	438
10	416	445	448

The tables illustrate the fact that scuPA was activated in a manner which was dependent on the concentration of the "FVII activator" and on the length of the incubation. At the same time, both heparin and calcium had a

stimulatory effect on the activation of the PA which was brought about by the protease.

sctPA activation(100  $\mu$ g of sctPA/ml, 50-200  $\mu$ g of "FVII activator"/ml)

Since the turnover rate of the activated tPA only increases by a factor of 3-4 as compared with the tPA proenzyme (while that of uPA increases by a factor of 1000-1500), higher concentrations of the two coreactants (see above) had to be selected in order to obtain an analyzable measurement signal.

Incubation time (min)	Resulting PA activity ( $\Delta$ mIU/min) "FVII activator" (200 $\mu$ g/ml)
1	10.2
2	16.8
5	38.8
10	60.2
20	73.3

- B. Dependence on the concentration of the "FVII activator" (incubation time: 20 min, at 37°C), stimulant: heparin (100 IU/ml)

"FVII activator" ( $\mu$ g/ml)	PA activity ( $\Delta$ mIU/min)
50	33.6
100	51.0
200	71.9

C. Stimulants (period of incubation: 20 min, at 37°C)

Stimulant	PA activity ( $\Delta$ mIU/min)
None	5.9
CaCl <sub>2</sub>	25.3
Heparin	63.8

The tables demonstrate that sctPA was also activated in a manner which was dependent on the concentration of the protease and on the incubation time. Both heparin and calcium ions had a stimulatory effect on the PA-activating ability of the "FVII activator".

**Example 8**

Two FVIII-containing solutions, one of which was essentially free of von Willebrand Factor while the other contained vWF, were incubated with the abovementioned protease in the presence of calcium. After predetermined times, the residual FVIII activities were determined by means of a chromogenic test and related to the control assays without protease.

For this, 25  $\mu$ l of a solution containing 0.1 IU of FVIII/ml were treated with the same volume of the protease solution (10  $\mu$ g/ml) and the whole was mixed with 25  $\mu$ l of CaCl<sub>2</sub> (25 mM). After incubation periods of 0, 5, 10 and 20 min at 37°C, the assays were in each case treated with 400  $\mu$ l of a solution containing 200 KIU of aprotinin/ml in order to stop the proteolytic activity of the protease. Preliminary experiments had shown that this concentration of aprotinin had no significant interfering effect on the FVIII activity test described below (assays 1 + 3). In assay 2, the protease was incubated with aprotinin prior to contact with FVIII, after which the procedure was as described above.

In each case, 50  $\mu$ l of the stopped sample (or after further dilution) were then treated with the so-called factor reagent, essentially composed of FIXa, FX and a thrombin inhibitor, and incubated at 37°C for 10 min. Following the addition of 50  $\mu$ l of a chromogenic substrate which is cleaved by activated FX, the reaction was stopped after 5 minutes of incubation by adding 50  $\mu$ l of acetic acid (50%); the  $\Delta OD_{405nm}$  was then measured. The FVIII activity (mIU) was ascertained with the aid of a standard curve which was constructed using a dilution series which was prepared from the FVIII concentrate and which was included in the test.

The FVIII activities are given in percentages of the controls to which protease was not added.

**Results:**

Assay	FVIII activity (%)			
	Incubation period (min)			
	0	5	10	20
1. FVIII	97	27	11	<1
2. FVIII/aprotinin	98	97	97	96
3. FVIII/vWF	98	16	14	1

In the presence of  $CaCl_2$  (in this case 6.25 mM), FVIII was inactivated by the protease in a manner which was dependent on the length of the incubation. The vWF did not protect the FVIII from inactivation by the protease. Inhibition of the protease with aprotinin prior to contact with FVIII prevented the latter from being inactivated.

### Example 9

This experimental series was carried out as described in example 1/assay 1, but in this case the concentrations of calcium in the mixtures of protease and FVIII were varied. For this,  $\text{CaCl}_2$  was added, from the stock solution of calcium, up to the final concentrations shown in Figure 3.

#### Results:

If the concentration of calcium in the assay is decreased below 1 mM, approx. 50% of the FVIII is then spared under these conditions. Below 0.5 mM calcium, the percentage spared is more than 60% (Fig. 1).

### Example 10

The influence of the "FVII activator" on the clotting times in so-called global tests was investigated by means of thromboelastography.

The change in the shear elasticity or the strength of the relevant blood clot was recorded continuously using a Hilgard TEG meter (from Hellige). The so-called r and k values are, respectively, the times from the beginning of blood withdrawal and from the start of the clotting reaction, and, in the case of citrate blood plasma, the time of recalcification until the TEG curve has been broadened by 1 mm and the time from the endpoint of the r value until the curve has been broadened to 20 mm (clot formation time).

For this, aliquots of 150  $\mu\text{l}$  of blood or plasma from 5 donors were in each case incubated in the measuring cuvettes at 37°C for 2 min, after which 50  $\mu\text{l}$  of sample (protease) were mixed in. The reaction was started by adding 100  $\mu\text{l}$  of 25 mM  $\text{CaCl}_2$ . The final concentration of the "FVII activator" in the assay was 15  $\mu\text{g/ml}$ . The shortening of the r time was



measured in relation to the assay which contained buffer instead of the sample.

**Results:**

Blood No.	Sample	r time (min)	k time (min)	r+k time (min)
1	Protease	5.2	3.4	8.6
1	Buffer	7.8	5.6	13.4
2	Protease	5.2	5.1	10.3
2	Buffer	6.8	7.1	13.9
3	Protease	4.0	5.2	9.2
3	Buffer	6.5	6.3	12.8
4	Protease	4.5	4.8	9.3
4	Buffer	4.8	6.0	10.8
5	Protease	4.2	3.8	8.0
5	Buffer	7.0	5.8	12.8

Plasma No.	Sample	r time (min)
1	Protease	9.0
1	Buffer	11.3
2	Protease	9.2
2	Buffer	12.5
3	Protease	9.5
3	Buffer	9.6
4	Protease	8.2
4	Buffer	12.1
5	Protease	9.7
5	Buffer	14.1

This example makes clear that, in almost all cases, addition of the protease resulted in a marked shortening of the clotting time. In this present instance, the fibrinolytic properties of the "FVII activator" receded into the background. A reason for this is that in "normal subjects", the concentrations of plasminogen activator in the plasma lie in the nanogram region and do not have any effect in the in-vitro clotting test.

#### Example 11

The FVIII-bypassing activity of the protease was demonstrated by the following experimental assay: thromboelastography was used as the measuring technique. The r time was evaluated (see Example 10). A sample of whole blood was incubated with a monoclonal antibody, whose FVIII-activity-inhibiting properties were known, in order to simulate the presence of a naturally occurring FVIII inhibitor (antibody against FVIII). This sample was compared with the whole blood sample control (buffer instead of Mab). The FEIB activity of the protease was tested by adding the protease (final concentration 17 µg/ml) to the whole blood sample which had been inhibited by the Mab. Protease was added to a further sample, and the effect of the protease, on its own, on the r time was determined.

#### Results:

	r time
Whole blood control	8.0
Whole blood + mAb	11.0
Whole blood + mAb + protease	8.0
Whole blood + protease	3.5

The lengthening of the  $t$  time, caused by the anti-FVIII mAb, was normalized once again by the presence of the protease, thereby illustrating the FEIB activity of the protease. On its own, the protease shortened the clotting time, as already demonstrated above.

### Example 12

The following substances were added to a solution, which contained 50  $\mu$ g of the FVII-activating protease/ ml, to give the corresponding final concentrations:

25 mM Na citrate

25 mM HEPES

100 mM arginine

0.75 g of sucrose/ml

The solution was divided into portions and the aliquots were in each case adjusted to different pH values of from 5.0 to 8.6 and then heated at 60°C for 10 hours.

The activities of the heated protease solutions were determined in a chromogenic test, with the time-dependent amidolysis of the chromogenic substrate S2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pHA  $\times$  2 HCl, Chromogenix AB, Sweden) being recorded. This activity was expressed as a percentage of the aliquots which were unheated and were measured in parallel:

## Results:

Assay	Activity (%)
Starting material	100
pH 5.0	76
pH 5.5	65
pH 6.1	81
pH 6.5	50
pH 7.1	43
pH 7.5	46
pH 8.1	46
pH 8.6	32

This series of experiments makes clear that the stabilization, particularly in the acid pH range, has markedly reduced the inactivation of the protease. The slight "breakthrough" at pH 5.5 can be explained by the fact that the isoelectric point of the protease is in this range. Na citrate prevents a loss of activity of > 50% occurring in the preferred pH range.

### Example 13

The assay at pH 6.1 (Example 1) showed the best stabilization of the protease. Accordingly, different additives were tested at pH 6.0 and evaluated as described in Example 1:

The following final concentrations were set, with the concentration of the protease being 50 µg/ml:

50 mM Na citrate/50 mM NaCl, pH 6.0

0.75 g of sucrose/ml

100 mM glycine

100 mM arginine

**Results:**

Assay	Activity (%)
Starting material	100
Na citrate/NaCl	54
Na citrate/NaCl/sucrose	85
Na citrate/NaCl/sucrose/glycine	92
Na citrate/NaCl/sucrose/arginine	97

Marked stabilization of the protease was demonstrated by adding sucrose and in each case one amino acid.

Patent claims US:

1. A protease for activating the blood clotting factor VII, which
  - a) is inhibited by the presence of aprotinin,
  - b) is increased in its activity by calcium ions and/or heparin or heparin-related substances and
  - c) in SDS-PAGE, on subsequent staining in the non-reduced state, has one or more bands in the molecular weight range from 50 to 75 kDa and in the reduced state has a band at 40 to 55 kDa and one or more bands in the molecular weight range from 10 to 35 kDa.
2. The protease as claimed in claim 1, wherein the band obtained in SDS-PAGE in the reduced state in the molecular weight range from 60 to 65 kDa and from 40 to 55 kDa has an amino acid sequence of LLESLDP and the band obtained in the molecular weight range from 10 to 35 kDa has an amino acid sequence of IYGGFKSTAGK.
3. The protease as claimed in claim 1, which is obtained by fractionation of blood plasma or of prothrombin complex (PPSB) concentrates.
4. A proenzyme of the protease as claimed in claim 1, which in SDS-PAGE in the reduced state has a band in the molecular weight range between 60 and 65 kDa and contains the amino acid sequences LLESLDP and IYGGFKSTAGK.

5. A process for obtaining or removing the protease of claim 1 as claimed, which comprises obtaining it from blood plasma or prothrombin (PPSB) concentrates after prior anion exchange chromatography by means of affinity chromatography using heparin or a substance related to heparin or dextran sulfate.
6. A reagent for the immunological detection of the protease of claim 1, which contains a polyclonal or monoclonal antibody against the protease or proenzyme.
7. A reagent for diagnostic/analytical purposes, which contains the protease of claim 1, optionally together with activities of the proenzyme.
8. 8. A reagent for the detection of factor VII, which contains the protease of claim 1, optionally together with protease activity enhancing compounds.
9. A test system for the qualitative and quantitative detection of a protease as claimed in claim 1, wherein the protease is measured by means of
  - a) its activity inactivating the blood clotting factors VIII/VIIIa or V/Va or
  - b) its activity reducing the blood clotting times in global clotting tests or
  - c) its activity activating plasminogen activators
  - d) its activity activating FVII.
10. The test system as claimed in claim 9, wherein the activity reducing the blood clotting times is determined by means of the
  - a) non-activated partial thromboplastin time (NAPTT) or of the
  - b) prothrombin time (PT) or of the

- c) plasma recalcification time or of the
- d) activated partial thromboplastin time (APTT).

11. The test system as claimed in claim 9, wherein the activity activating and/or potentiating the plasminogen activators is measured by the activation of the

a) single chain urokinase PA (scuPA, single chain urokinase plasminogen activator) or of the

b) single chain tPA (sctPA, single chain tissue plasminogen activator).

12. The test system as claimed in claim 9, which contains calcium ions in an amount of more than 0.001 mM, preferably in an amount of more than 0.005 mM.

13. An assay system where the protease and/or a mixture of the proenzyme and appropriate proenzyme activators are used to test the prothrombin time substituting tissue factor/thromboplastin.

14. An assay system where the protease and/or a mixture of the proenzyme and appropriate proenzyme activators are used to test the functionality of plasminogen activators and for quantification of the single chain plasminogen activator forms.

15. The test system as claimed in claim 9, wherein the activity potentiating the plasminogen activators

a) is measured using a chromogenic test or



b) in a coupled reaction in the presence of plasminogen, the plasmin formation itself or the dissolution of a fibrin clot brought about by plasmin being determined.

16. A stabilized factor V and stabilized factor VIII preparation, which is free of the inactive factor VIII and factor V fragments formed due to proteolytic degradation as a result of the inhibition of the protease activating the blood clotting factor VII.
17. The stabilized preparation as claimed in claim 16, wherein, for the inhibition of the protease activating the blood clotting factor VII, the concentration of calcium ions in the factor VIII or in the factor V preparation is less than 1.0 mM, preferably less than 0.5 mM.
18. The stabilized preparation as claimed in claim 17, wherein the FVIII- or FV-containing solution has been brought into contact with immobilized heparin, immobilized heparin-like substances or immobilized dextran sulfate and as a result a solution which is completely or partially freed of protease/proenzyme has been obtained.
19. The stabilized preparation as claimed in claims 17, which is protected against the proteolytic degradation by the protease activating the blood clotting factor VII by the addition of a natural or synthetic protease inhibitor.
20. A stabilized solution of the protease or of the proenzyme as claimed in claim 1, which is adjusted to a pH of 4.0 to 9.0 by addition of a buffer and/or contains ethylene glycol or glycerol in an amount of 5-80% by weight.
21. A pharmaceutical preparation, which contains an amount of the protease activating the blood clotting factor VII, and/or its proenzyme, adequate for the dissolution of fibrin-containing thrombi.

22. The pharmaceutical preparation as claimed in claim 21, which, apart from the protease activating the blood clotting factor VII, and/or its proenzyme, contains single chain or two chain plasminogen activators (PA) and/or anticoagulants.
23. The pharmaceutical preparation as claimed in claim 21, which additionally contains soluble calcium salts and/or heparin or heparin-like substances.
24. A pharmaceutical preparation for decreasing the coagulability of the blood, which contains a protease inhibitor such as aprotinin and/or C1-inhibitor and/or  $\alpha_2$ -Antiplasmin and/or Inter- $\alpha$ -Trypsin-Inhibitor and/or AT III/heparin for the inhibition of the protease and/or its proenzyme as claimed in claim 1.
25. A process for the production of a pharmaceutical preparation comprising the protease and/or the enzyme as claimed in claim 1, which comprises preparing the preparation
  - a) in a pH range from 3.5 to 8.0
  - b) with addition of one or more amino acids in an amount of  $> 0.01$  mol/l and/or
  - c) with addition of a sugar or a combination of a number of sugars in a total amount of  $> 0.05$  g/ml and/or
  - d) with addition of one or more substances which are able to complex calcium ionsunder pasteurization conditions.

26. A pharmaceutical preparation, which is obtainable by the process as claimed in claim 25.
27. The use of the protease or its proenzyme, optionally together with proenzyme activators prepared from blood plasma or prothrombin complex (PPSB) concentrates or expressed recombinantly or transgenically, as claimed in claim 1, for the promotion of wound healing and hemostasis, as an additive of a fibrin adhesive or fleece or other release system which is suitable for rapid wound closure, based on fibrin, for substitution in inborn or acquired deficiency states of this protease or its proenzyme, in the presence of antibodies against the blood clotting factor VIII or for the in vitro activation of factor VII.

### Protease for activating clotting factor VII

A protease for activating the blood clotting factor VII is described, which

- a) is inhibited by the presence of aprotinin,
- b) is increased in its activity by calcium ions and/or heparin or heparin-related substances, and
- c) in SDS-PAGE, on subsequent staining in the non-reduced state, has one or more bands in the molecular weight range from 50 to 75 kDa and kDa in the reduced state has a band at 40 to 55 kDa and one or more bands in the molecular weight range from 10 to 35 kDa.

The proenzyme of this protease is also characterized. Moreover, a process for obtaining this protease and its use in hemorrhage prophylaxis or hemostasis is described. A stabilized factor V and a stabilized factor VIII preparation are furthermore described which are free of the inactive factor VIII fragments formed by proteolytic degradation as a result of the inhibition or the removal of the protease activating the blood clotting factor VII.

Moreover, a test system for the qualitative and quantitative detection of a protease which activates the blood clotting factor VII is described, in which the protease is determined by its

- a) action inactivating the blood clotting factors VIII/VIIIa or V/Va or
- b) action reducing the blood clotting times in global clotting tests or
- c) action activating plasminogen activators.

Finally, pharmaceutical preparations are described which are suitable for the prophylaxis and treatment of bleeding events, e.g. in the presence of FVIII inhibitors, wound healing and for the treatment of disorders which are caused by fibrin-containing thrombin. The preparations contain the protease activating the blood clotting factor VII, or its proenzyme. With addition of special stabilizers, they can be pasteurized with only small losses of action.

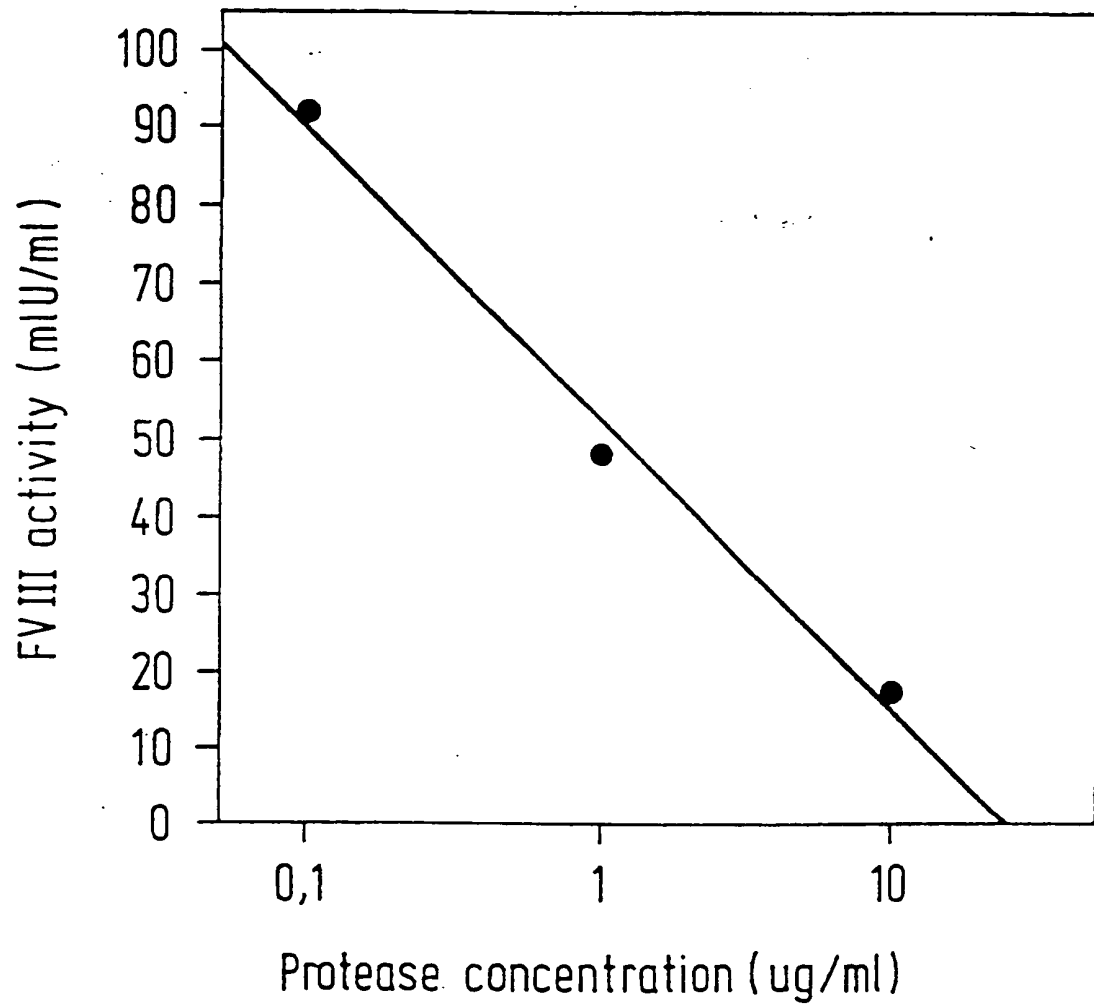
Figure 1

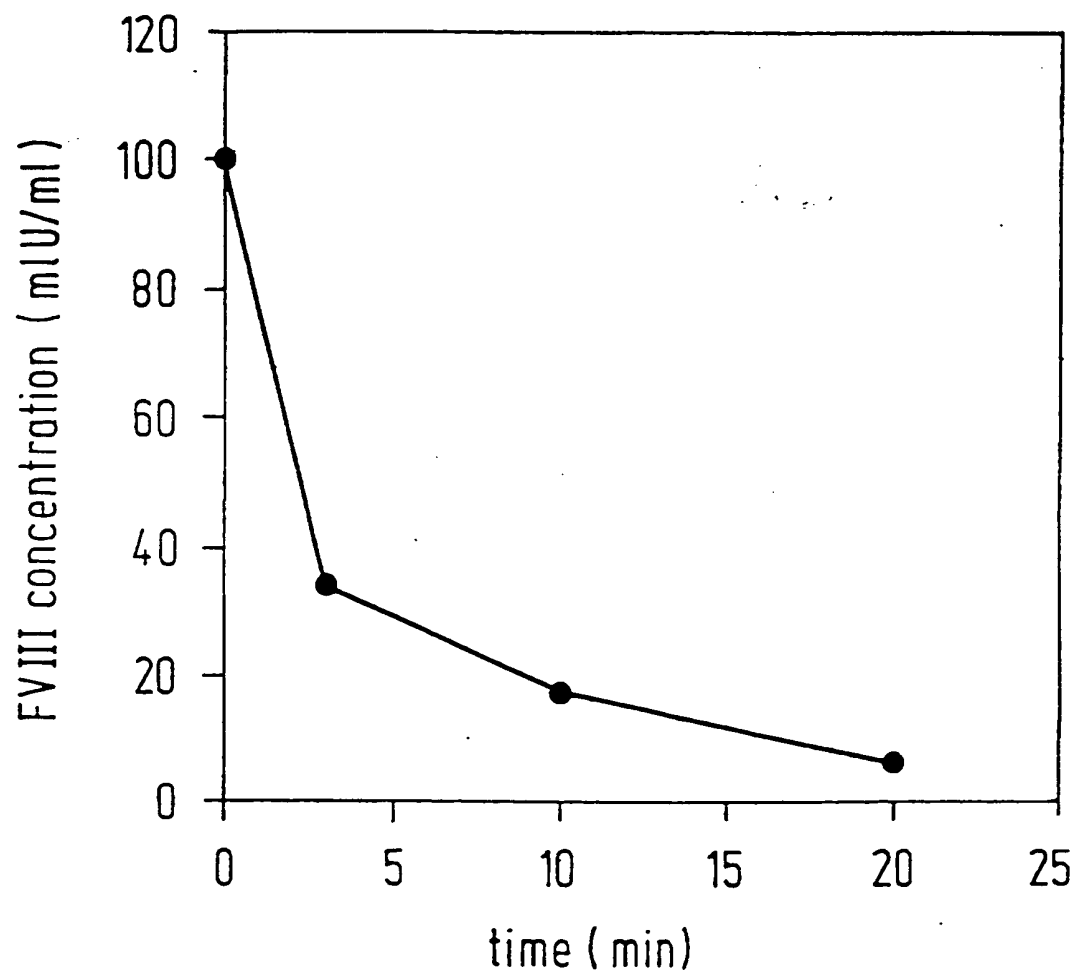
Figure 2

Figure 3